

**FETTSÄUREMUSTER UND POSITIONSSPEZIFISCHE
VERTEILUNG DER FETTSÄUREN
IN DEN POLAREN LIPIDEN VON STREPTOCOCCEN**

von

HANS-ROBERT LANDGRAF

aus Chemnitz

1976 № 347



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FETTSÄUREMUSTER UND POSITIONSSPEZIFISCHE VERTEILUNG DER FETTSÄUREN IN DEN POLAREN LIPIDEN VON STREPTOCOCCEN

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen

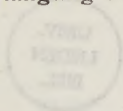
der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt von

HANS-ROBERT LANDGRAF

aus Chemnitz

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fachbereichen der Universität Erlangen - Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: am 21. 7. 1976

Vorsitzender der kommissarischen

Promotionskommission:

Prof. Dr. H. Remmert

Erstberichterstatte

Prof. Dr. O. Dann

Zweitberichterstatte

Prof. Dr. H. Kersten

Drittberichterstatte

Prof. Dr. W. Fischer



1	Einleitung	1
2	1.1 Die Bedeutung der Eltern	2
3	1.2 Die Rolle der Eltern	3
4	1.3 Die Verantwortung der Eltern	4
5	1.4 Die Liebe der Eltern	5
6	1.5 Die Erziehung der Eltern	6
7	1.6 Die Unterstützung der Eltern	7
8	1.7 Die Anerkennung der Eltern	8
9	1.8 Die Dankbarkeit der Eltern	9
10	1.9 Die Liebe der Eltern	10
11	1.10 Die Verantwortung der Eltern	11
12	1.11 Die Unterstützung der Eltern	12
13	1.12 Die Anerkennung der Eltern	13
14	1.13 Die Liebe der Eltern	14
15	1.14 Die Verantwortung der Eltern	15
16	1.15 Die Unterstützung der Eltern	16
17	1.16 Die Anerkennung der Eltern	17
18	1.17 Die Liebe der Eltern	18
19	1.18 Die Verantwortung der Eltern	19
20	1.19 Die Unterstützung der Eltern	20
21	1.20 Die Anerkennung der Eltern	21
22	1.21 Die Liebe der Eltern	22
23	1.22 Die Verantwortung der Eltern	23
24	1.23 Die Unterstützung der Eltern	24
25	1.24 Die Anerkennung der Eltern	25
26	1.25 Die Liebe der Eltern	26
27	1.26 Die Verantwortung der Eltern	27
28	1.27 Die Unterstützung der Eltern	28
29	1.28 Die Anerkennung der Eltern	29
30	1.29 Die Liebe der Eltern	30
31	1.30 Die Verantwortung der Eltern	31
32	1.31 Die Unterstützung der Eltern	32
33	1.32 Die Anerkennung der Eltern	33
34	1.33 Die Liebe der Eltern	34
35	1.34 Die Verantwortung der Eltern	35
36	1.35 Die Unterstützung der Eltern	36
37	1.36 Die Anerkennung der Eltern	37
38	1.37 Die Liebe der Eltern	38
39	1.38 Die Verantwortung der Eltern	39
40	1.39 Die Unterstützung der Eltern	40
41	1.40 Die Anerkennung der Eltern	41
42	1.41 Die Liebe der Eltern	42
43	1.42 Die Verantwortung der Eltern	43
44	1.43 Die Unterstützung der Eltern	44
45	1.44 Die Anerkennung der Eltern	45
46	1.45 Die Liebe der Eltern	46
47	1.46 Die Verantwortung der Eltern	47
48	1.47 Die Unterstützung der Eltern	48
49	1.48 Die Anerkennung der Eltern	49
50	1.49 Die Liebe der Eltern	50
51	1.50 Die Verantwortung der Eltern	51
52	1.51 Die Unterstützung der Eltern	52
53	1.52 Die Anerkennung der Eltern	53
54	1.53 Die Liebe der Eltern	54
55	1.54 Die Verantwortung der Eltern	55
56	1.55 Die Unterstützung der Eltern	56
57	1.56 Die Anerkennung der Eltern	57
58	1.57 Die Liebe der Eltern	58
59	1.58 Die Verantwortung der Eltern	59
60	1.59 Die Unterstützung der Eltern	60
61	1.60 Die Anerkennung der Eltern	61
62	1.61 Die Liebe der Eltern	62
63	1.62 Die Verantwortung der Eltern	63
64	1.63 Die Unterstützung der Eltern	64
65	1.64 Die Anerkennung der Eltern	65
66	1.65 Die Liebe der Eltern	66
67	1.66 Die Verantwortung der Eltern	67
68	1.67 Die Unterstützung der Eltern	68
69	1.68 Die Anerkennung der Eltern	69
70	1.69 Die Liebe der Eltern	70
71	1.70 Die Verantwortung der Eltern	71
72	1.71 Die Unterstützung der Eltern	72
73	1.72 Die Anerkennung der Eltern	73
74	1.73 Die Liebe der Eltern	74
75	1.74 Die Verantwortung der Eltern	75
76	1.75 Die Unterstützung der Eltern	76
77	1.76 Die Anerkennung der Eltern	77
78	1.77 Die Liebe der Eltern	78
79	1.78 Die Verantwortung der Eltern	79
80	1.79 Die Unterstützung der Eltern	80
81	1.80 Die Anerkennung der Eltern	81
82	1.81 Die Liebe der Eltern	82
83	1.82 Die Verantwortung der Eltern	83
84	1.83 Die Unterstützung der Eltern	84
85	1.84 Die Anerkennung der Eltern	85
86	1.85 Die Liebe der Eltern	86
87	1.86 Die Verantwortung der Eltern	87
88	1.87 Die Unterstützung der Eltern	88
89	1.88 Die Anerkennung der Eltern	89
90	1.89 Die Liebe der Eltern	90
91	1.90 Die Verantwortung der Eltern	91
92	1.91 Die Unterstützung der Eltern	92
93	1.92 Die Anerkennung der Eltern	93
94	1.93 Die Liebe der Eltern	94
95	1.94 Die Verantwortung der Eltern	95
96	1.95 Die Unterstützung der Eltern	96
97	1.96 Die Anerkennung der Eltern	97
98	1.97 Die Liebe der Eltern	98
99	1.98 Die Verantwortung der Eltern	99
100	1.99 Die Unterstützung der Eltern	100
101	1.100 Die Anerkennung der Eltern	101

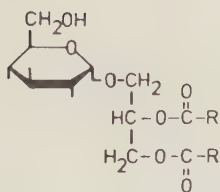
Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Formeln der Gluco-, Phospho- und Phosphoglu- colipide	1
Zusammenfassung	3
Einleitung und Problemstellung	5
I Extraktion der Lipide und Ermittlung der Lipid- zusammensetzung	9
I.1 Extraktion der Lipide	9
I.2 Identifizierung der Lipide	11
I.3 Lipidmuster der untersuchten Streptococce- stämmen	11
II Trennung der Lipide	17
II.1 Prinzip und Wahl der Methoden	17
II.1.1 Trennleistung von Kieselgel	17
II.1.2 Trennleistung von DEAE-Cellulose, Acetat- form	20
II.1.3 Einfluß der Kettenlänge der Fettsäuren auf das Trennverhalten polarer Lipide	25
II.2 Isolierung der Lipide aus <i>S. haemolyticus</i> D-58	28
II.2.1 Fraktionierung der Lipid-Rohextrakte über DEAE- Cellulose, Acetatform	28
II.2.2 Weiteres Vorgehen	31
II.2.3 Trennung von Glucosyl- und N-Acetylglucosaminyl- diglycerid	31
II.2.4 Reinigung von α -Kojibiosyldiglycerid und α -Koji- triosyldiglycerid	34
II.2.5 Reinigung von Acylphosphatidylglycerin und Phospho- glucolipid III	34
II.2.6 Trennung von Phosphatidylglycerin und Phosphoglu- lipid III	38
II.2.7 Isolierung von Cardiolipin und Phosphoglu- colipid V	42
II.2.8 Isolierung von Phosphoglu- colipid IV	43
II.2.9 Bilanz der Trennung	47

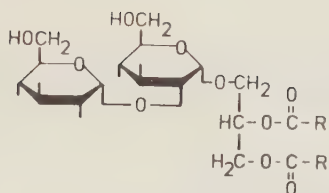
II.3	Isolierung der Lipide aus <i>S. faecalis</i> var. <i>faecalis</i> und var. <i>zymogenes</i>	49
II.3.1	Isolierung von α -Kojibiosyldiglycerid	50
II.3.2	Isolierung von Cardiolipin, Phosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid III	50
II.3.3	Isolierung von Phosphoglucolipid V und VI	51
III	Analyse der Fettsäuren	53
III.1	Identifizierung	53
III.2	Quantifizierung	56
IV	Analyse der Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Gluco-, Phospho- und Phosphoglucolipiden	57
IV.1	Analyse der Fettsäureverteilung in Glucolipiden mit Lipase aus <i>Rhizopus arrhizus</i>	57
IV.2	Analyse der Fettsäureverteilung in Phospholipiden mit Phospholipase A_2	58
IV.3.	Analyse der Fettsäureverteilung in Phosphoglucoli- piden	67
IV.3.1	Kombinierter Abbau der Phosphoglucolipide mit 60 proz. HF, Phospholipase A_2 und <i>Rhizopus</i> lipase	68
IV.3.2	Kombinierter Abbau der Phosphoglucolipide mit Phospho- lipase A_2 , 98 proz. Essigsäure und <i>Rhizopus</i> lipase	75
IV.3.3	Analyse der Fettsäureverteilung in Phosphoglucolipid VI	80
IV.4	Analyse der Fettsäureverteilung in Acylphosphatidyl- glycerin	80
V	Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fett- säuren in den polaren Lipiden verschiedener <i>Strepto-</i> <i>coccus</i> stämmen	85
V.1	Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fett- säuren in den polaren Lipiden von <i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i> var. <i>faecalis</i> und <i>Streptococcus faecalis</i> var. <i>zymogenes</i>	85

V.2	Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren in den polaren Lipiden von <i>Streptococcus lactis</i>	96
V.3	Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren in den polaren Lipiden aus <i>Streptococcus haemolyticus</i> D-58	101
VI.	Dikussion	113
VI.1	Fettsäuremuster und Fettsäuresynthese	113
VI.2	Fettsäureverteilung und Lipidsynthese	118
VI.3	Modifikation der Lipide in <i>S.faecalis</i> : Bildung von C ₁₉ -Cyclopropansäure	127
VI.4	Modifikation der Lipide in <i>S.haemolyticus</i> : De- und Reacylierung oder Spezies-Selektionierung	129
VI.5	Fettsäurepositionsverteilung und Biosynthese von Phosphoglucolipiden	135
VII.	Materialien und Methoden	140
VII.1	Materialien	140
VII.2	Züchtung und Extraktion der Bakterien	141
VII.3	Säulenchromatographie	143
VII.3.1	Säulen mit DEAE-Cellulose, Acetatform	143
VII.3.2	Säulen mit Kieselgel	145
VII.3.3	Säulen mit "Na-Kieselgel"	146
VII.3.4	Aufarbeitung der Fraktionen	146
VII.4	Dünnschichtchromatographie	148
VII.4.1	Präparative Dünnschichtchromatographie	148
VII.4.2	Analytische Dünnschichtchromatographie	149
VII.5	Gaschromatographie	151
VII.6	Chemische Spaltungen	152

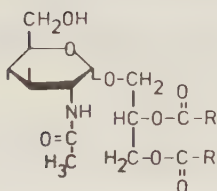
VII.6.1	Desacylierung der Lipide zur Darstellung der Fettsäuren	152
VII.6.2	Phosphodieterspaltung in Phosphoglucolipiden mit 60 proz. HF	154
VII.6.3	Phosphodieterspaltung in Phosphoglucolipiden mit 98 proz. Essigsäure	156
VII.6.4	Desacylierung und Phosphodieterspaltung in 0,1 M NaOH bei 100° C	157
VII.7	Enzymatische Spaltungen	158
VII.7.1	Abbau der Glucolipide mit Rhizopuslipase	158
VII.7.2	Abbau von Phospholipiden und Phosphoglucolipiden mit Phospholipase A ₂	160



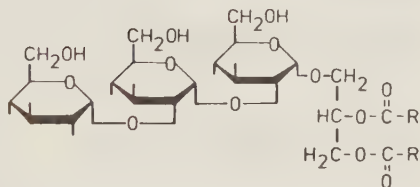
MONOGLUCOSYL
DIGLYCERID



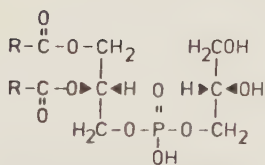
α-KOJIBIOSYLDIGLYCERID



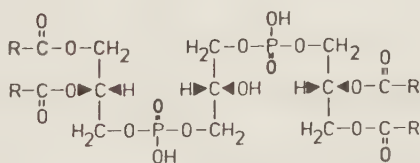
N-ACETYLGLUCOS-
AMINYLDIGLYCERID



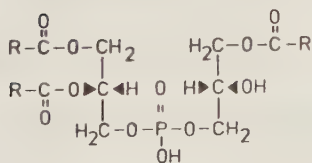
α-KOJITRIOSYLDIGLYCERID



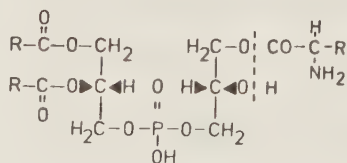
PHOSPHATIDYLGlycerin



DIPHOSPHATIDYLGlycerin



ACYL-PHOSPHATIDYLGlycerin



AMINOACYL-
PHOSPHATIDYLGlycerin

Struktur der Glyko- und Phospholipide

Systematische Bezeichnungen der Verbindungen sind auf der nächsten Seite aufgeführt.

Systematische Bezeichnungen der auf Seite 1 dargestellten Gluco- und Phospholipide

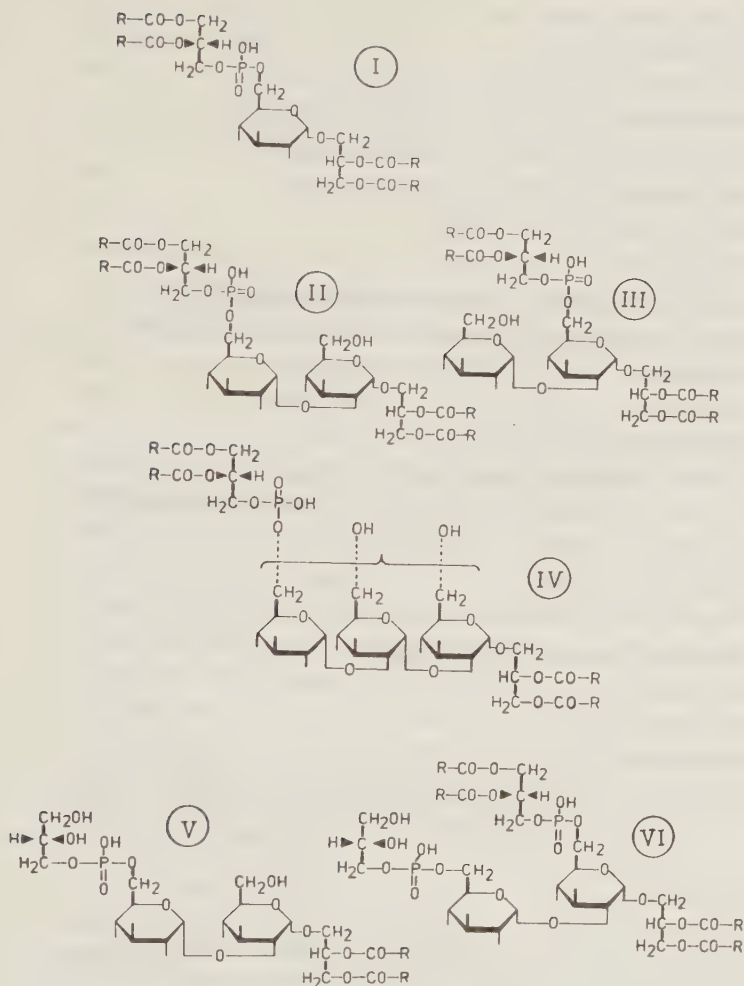
GLUCOLIPIDE (22)

Monoglucosyldiglycerid (MGDG)	3(1)-O-(α -D-Glucopyranosyl)- 1(3),2-diacylglycerin
N-Acetylglucosaminyl- diglycerid (Nacglc-DG)	3(1)-O-(2-Acetamido-2-des- oxy- α -D-glucopyranosyl)-1(3), 2-diacylglycerin
α -Kojibiosyldiglycerid Diglucosyldiglycerid (DGDG)	3(1)-O- [2'-O-(α -D-Glucopyra- nosyl)- α -D-glucopyranosyl] -1(3) 2-diacylglycerin
α -Kojitriosyldiglycerid Triglucosyldiglycerid (TGDG)	3(1)-O- [2"-O-(α -D-Glucopyra- nosyl)-2'-O-(α -D-glucopyrano- syl)- α -D-glucopyranosyl] -1(3), 2-diacylglycerin

PHOSPHOLIPIDE

Phosphatidylglycerin (PG)	1',2'-Diacyl-sn-glycero-3'- phosphoryl-1-sn-glycerin
Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin, DPG)	1,3-Di-(1,2-diacyl-sn-glycero- 3-phosphoryl)-sn-glycerin
Acylphosphatidylglycerin (Ac-PG)	1-(1,2-Diacyl-sn-glycero-3- phosphoryl)-3-acyl-sn-glycerin
Aminoacylphosphatidyl- glycerin (Aminoacyl-PG)	1-(1,2-Diacyl-sn-glycero-3- phosphoryl)-3(2)-aminoacyl- sn-glycerin

"sn" ist die Abkürzung für stereospecific numbering. Sie wurde 1967 von der IUPAC-IUB Commission für biochemische Nomenklatur zur Bezeichnung von Glycerinderivaten empfohlen (vgl. 163). Danach wird das Glycerinmolekül in der Fischer-Projektion so geschrieben, daß die sekundäre Hydroxylgruppe links vom mittleren C-Atom (C-2) zu stehen kommt. Das darüberliegende C-Atom erhält dann die Ziffer 1, das darunterliegende die Ziffer 3.



Struktur der Phosphoglucolipide

Systematische Bezeichnungen der Verbindungen sind auf der nächsten Seite aufgeführt.

Sytematische Bezeichnungen der auf Seite 2 dargestellten Phosphoglucolipide

Phosphoglucolipid I

3(1)-O- [6'-(1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-
 α -D-glucopyranosyl] -1(3),2-diacylglycerin

Phosphoglucolipid II

3(1)-O- [6''-(1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-
2'-O- (α -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranosyl] -1(3),2-
diacylglycerin

Phosphoglucolipid III

3(1)-O- [6'-(1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-
2'-O- (α -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranosyl] -1(3),2-
diacylglycerin

Phosphoglucolipid IV ¹⁾

Phosphatidyl-3(1)-O- (α -Kojitriosyl)-1(3),2-
diacylglycerin

Phosphoglucolipid V

3(1)-O- [6''-(sn-Glycero-1-phosphoryl)-2'-O- (α -D-glucopy-
ranosyl)- α -D-glucopyranosyl] -1(3),2-diacylglycerin

Phosphoglucolipid VI

3(1)-O- [6''-(sn-Glycero-1-phosphoryl)-6'-(1,2-diacyl-
sn-glycero-3-phosphoryl)-2'-O- (α -D-glucopyranosyl)- α -D-
glucopyranosyl] -1(3),2-diacylglycerin

¹⁾ Die Lokalisation des Phosphatidylrestes am α -Koji-
triosylanteil steht noch aus.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine systematische Untersuchung der Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren in Glyko-, Phospho- und Phosphoglykolipiden grampositiver Bakterien durchgeführt.
2. Isoliert wurden die vorgenannten Lipide aus *Streptococcus faecalis* varietas *faecalis* und varietas *zymogenes*, sowie aus *Streptococcus haemolyticus* D-58.
3. Die Fraktionierung der Lipidrohextrakte erfolgte über DEAE-Cellulose (Acetatform). Durch Einführung eines feingestuftten Ammoniumacetatgradienten gelang es, anionische Lipide nicht nur nach Anzahl der negativen Ladungen, sondern auch nach ihrer Tendenz zur Wasserstoffbrückenbildung zu trennen (kombinierte Ionenaustausch- und Adsorptionschromatographie).
4. Die aus den oben genannten drei Bakterien und aus *Streptococcus lactis* isolierten Lipide wurden der Fettsäureverteilungsanalyse unterworfen. Glykolipide wurden hierfür mit der 1-Position-spezifischen Lipase aus *Rhizopus arrhizus*, Phospholipide mit Phospholipase A₂ hydrolysiert. Für den Abbau von Phosphoglykolipiden wurden enzymatische und chemische Spaltungen kombiniert, wodurch die Fettsäuren aus den vier Positionen getrennt der Analyse zugänglich wurden.
5. In *S. faecalis* und *S. lactis* haben Glyko- und Phospholipide dieselbe Fettsäurezusammensetzung. Die Fettsäuren sind in beiden Lipidklassen auf dieselbe Weise auf die beiden Positionen der Glycerinanteile verteilt. Die Verteilung erfolgt asymmetrisch nach einem ungewöhnlichen Verteilungsprinzip, das nach Kettenlänge der Fettsäuren selektioniert. Glykolipid- und

Phosphatidylanteile der Phosphoglykolipide entsprechen in Zusammensetzung und Verteilung der Fettsäuren den einfachen Glyko- und Phospholipiden.

6. In *S.haemolyticus* unterscheiden sich Glyko- und Phospholipide in der Fettsäurezusammensetzung; selbst innerhalb der beiden Reihen werden Unterschiede deutlich. Die Verteilung erfolgt mehr oder weniger zufallsbedingt; sie ist in Glyko- und Phospholipiden nicht einheitlich. Die Phosphoglykolipide bilden eine dritte Gruppe. Die Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren ihrer Glykolipid- und Phosphatidylanteile ist der von Glyko- und Phospholipiden ähnlich, aber nicht mit ihr identisch.
7. Die Ergebnisse werden an der Lipidbiosynthese in Bakterien diskutiert. Eine gemeinsame Phosphatidsäure als Biosynthesevorstufe erklärt die Einheitlichkeit der Glyko- und Phospholipide in *S.lactis* und *S.faecalis*. Modifizierende Einflüsse wie Speziesselektionierung auf einzelnen Stufen der Lipidsynthese oder De- und Reacylierungen an den fertigen Lipiden werden als Ursache der in den Lipiden von *S.haemolyticus* gefundenen Heterogenität erörtert.

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Lipidzusammensetzung grampositiver und gramnegativer Bakterien unterscheidet sich hauptsächlich darin, daß in grampositiven Bakterien neben Phospholipiden Glykolipide gefunden werden (1, 2, 3). Ihr Anteil variiert je nach Bakterienart zwischen 5 und 60 %. Hauptsächlichster Vertreter ist in den meisten Bakterien Dihexosyldiglycerid, neben welchem Mono- und Trihexosyldiglycerid in meist geringer Menge vorhanden sein können (2). Bisher wurden fünf Dihexosyldiglyceridtypen isoliert (1):

- 1- $\left[\text{O-}\alpha\text{-D-Galactopyranosyl-(1-2)-O-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl} \right]\text{-2,3-}$
diglycerid
- 1- $\left[\text{O-}\alpha\text{-D-Mannopyranosyl-(1-3)-O-}\alpha\text{-D-mannopyranosyl} \right]\text{-2,3-}$
diglycerid
- 1- $\left[\text{O-}\beta\text{-D-Glucopyranosyl-(1-6)-O-}\beta\text{-D-glucopyranosyl} \right]\text{-2,3-}$
diglycerid
- 1- $\left[\text{O-}\alpha\text{-D-Glucopyranosyl-(1-2)-O-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl} \right]\text{-2,3-}$
diglycerid
- 1- $\left[\text{O-}\beta\text{-D-Galactopyranosyl-(1-6)-O-}\beta\text{-D-galactopyranosyl} \right]\text{-2,3-}$
diglycerid.

Die einzelnen Typen werden jeweils bei taxonomisch einander nahestehenden Organismen gefunden (1, 2).

Nach Analyse von Zellfraktionen aus *S. faecalis* (4), *S. pyogenes* (5), *S. aureus* (6) und *B. subtilis* (7) sind Glykolipide wie Phospholipide ausschließlich Bestandteile der Cytoplasmamembran. Die meisten Hypothesen über Funktionen der Glykolipide in der Cytoplasmamembran wurden widerlegt oder blieben unbewiesen (vgl. 2, 8, 9). Eine in den letzten Jahren herausgearbeitete Teilfunktion besteht darin, daß Glykolipide Makromoleküle in covalenter Bindung tragen können, die damit, an der Außenseite der Cytoplasmamembran verankert, das Peptidoglycangerüst der Zellwand peripherwärts bis oft nahe an die

Zelloberfläche durchziehen. Ein Beispiel sind die Lipoteichonsäuren, deren mit Disacchariden und Aminosäuren substituiertes Polyglycerinphosphatgerüst über eine Phosphodiesterbindung an das Dihexosyldiglycerid der Membran gebunden ist (10 - 13). Die in den meisten grampositiven Bakterien vermutete Lipoteichonsäure ist in Micrococccen durch ein mit Succinat substituiertes Polymannan ersetzt, das offensichtlich durch eine glykosidische Bindung an das Dimannosyldiglycerid in der Cytoplasmamembran verankert ist (14).

1968 wurden in grampositiven Bakterien Phosphoglykolipide als dritte Lipidklasse nachgewiesen (15, 16). Wie die für die aus Streptococccen isolierten Verbindungen (17 - 22) auf Seite 2 gegebenen Strukturformeln zeigen, handelt es sich dabei um Phosphatidyl- oder Glycerophosphoryl-Derivate der einfachen Glykolipide. In der Zwischenzeit wurde eine ganze Reihe dieser Verbindungen auch aus anderen Bakterien isoliert (23 - 27). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß sie wie Glyko- und Phospholipide Bestandteile der Cytoplasmamembran sind (20). Ihre funktionelle Bedeutung ist noch ebenso unklar wie die der Glykolipide. Mögliche Beziehungen zur Lipoteichonsäure wurden diskutiert (28, 29).

Die bisherigen Arbeiten über Glyko- und Phosphoglykolipide beschäftigten sich fast ausschließlich mit der Struktur der hydrophilen Anteile. Die Fettsäurezusammensetzung blieb weitgehend unberücksichtigt; Untersuchungen über die Verteilung der Fettsäuren auf die beiden Positionen der Glycerinanteile fehlen praktisch völlig.

Die vorliegende Arbeit versucht, diese Lücke durch vergleichende Analysen der Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren in Glyko-, Phospho- und Phosphoglykolipiden zu schließen. Als besonders geeignet hier-

für erschienenen Streptococcen, die neben den auf Seite 1 wiedergegebenen einfachen Glyko- und Phospholipiden sechs Phosphoglucolipide synthetisieren (Seite 2).

Am interessantesten erwies sich *S. haemolyticus* D-58, aus dem 12 verschiedene Lipide isoliert werden konnten.

Die vergleichenden Analysen sollten folgende Fragen beantworten:

- (i) Besitzen einfache Glykolipide und Phospholipide identische, ähnliche oder unterschiedliche Fettsäurezusammensetzungen und Verteilungsmuster?
- (ii) Sind die beiden Lipidreihen in sich einheitlich oder unterschiedlich?
- (iii) Entsprechen die Fettsäuremuster im Glykolipid- und Phosphatidylanteil der Phosphoglucolipide dem der aus den Bakterien isolierbaren einfachen Glykolipide und Phospholipide?
- (iv) Sind in den verschiedenen Streptococcenstämmen einheitliche oder unterschiedliche Fettsäuremuster realisiert?

Zum einen sind diese Fragen hinsichtlich der Biosynthese und des Stoffwechsels dieser Lipide von Interesse. Nach in-vitro-Versuchen lassen sich die Diglyceridanteile in Glykolipiden und Phospholipiden aus Phosphatidsäure als gemeinsamer Vorstufe ableiten (vgl. Seite 120), während die phosphatidylhaltigen Phosphoglucolipide aus ihrer Struktur (Seite 2) und in Biosyntheseversuchen (30) unschwer die Herkunft ihrer beiden Diglyceridanteile aus der Glyko- und Phospholipidreihe erkennen lassen. Unter diesem Gesichtspunkt würde Einheitlichkeit des Fettsäuremusters in den drei Lipidklassen Festlegung derselben auf der Stufe der Phosphatidsäure bedeuten, Unterschiedlichkeit zur neuen Frage führen, durch welche Mechanismen diese zustande kommt.

Zum anderen ist die Kenntnis der Fettsäurezusammensetzung für das Verständnis der Funktion von Membranlipiden erforderlich, da die physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht nur durch die Struktur der polaren Kopfstücke, sondern insbesondere durch die Art der Fettsäuren bestimmt werden (31). Vergleichende Analysen von Glyko- und Phospholipiden sollten deshalb entscheiden lassen, ob Glykolipide in der Membran nur eine Modifikation der polaren Kopfstücke oder auch eine veränderte Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffketten bedingen.

I. EXTRAKTION DER LIPIDE UND ERMITTLUNG DER LIPIDZUSAMMENSETZUNG

I.1 Extraktion der Lipide

Nach dem Ernten wurden die feuchten Bakterien nach Ballou und Prottey (31) extrahiert. Die Notwendigkeit der mehrmaligen Extraktion bei diesem Verfahren geht aus Tabelle 1 hervor, welche zeigt, daß im ersten Extrakt nur etwa 60 % des Gesamtlipids vorhanden sind. Dadurch kann eine gewisse Selektionierung und Verfälschung des Lipidmusters erfolgen, da im ersten Extrakt einfache Glycolipide und Phosphoglycerolipid V stärker angereichert sind als in den folgenden, während Diphosphatidylglycerin und die phosphatidylhaltigen Phosphoglycerolipide I-IV sich umgekehrt verhalten (Abbildung 1).

Tab. 1 Extraktion der Lipide aus Streptococcus haemolyticus D-58. Zur ersten Extraktion wurden die Bakterien mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator im organischen Lösungsmittel suspendiert. Jede Extraktion erfolgte mit 5 ml Lösungsmittel pro 1 g Bakterienfeuchtgewicht unter mechanischem Rühren über die unten gegebene Zeit. Nach jeder Extraktion wurde das lipidhaltige Lösungsmittel vom Rückstand durch Zentrifugieren oder Filtration über einen Büchnertrichter abgetrennt.

	Chloroform-Methanol (v/v)	Dauer (Std.)	extrahiertes Lipid (g)	(%)
1. Extraktion	1:1	12	2,95	61,6
2. Extraktion	2:1	24	1,18	24,6
3. Extraktion	2:1	24	0,44	9,2
4. Extraktion	2:1	24	0,21	4,4
5. Extraktion	2:1	24	0,05	1,0

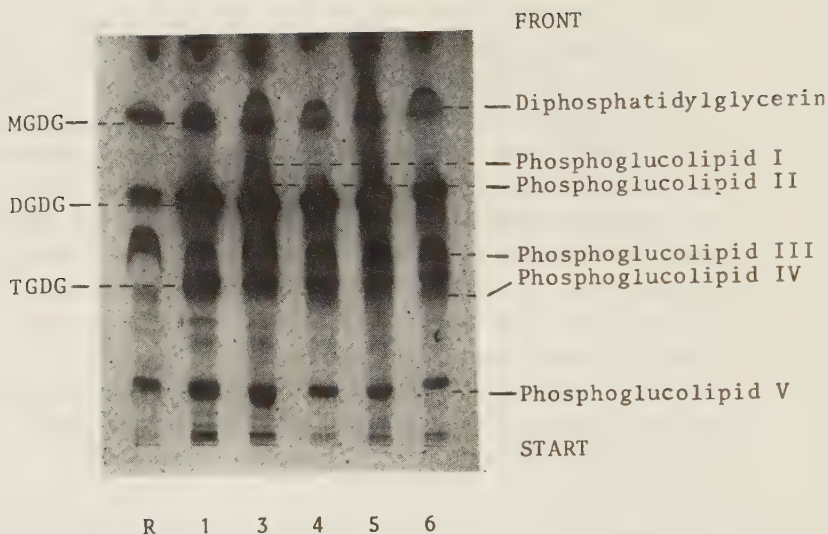


Abb. 1 Lipidzusammensetzung der Extrakte aus *S. haemolyticus* bei fünffacher Extraktion entsprechend Tabelle 1. 1) - 5), Extrakt 1 - 5 (vgl. Tabelle 1); R, Lipidrohextrakt aus *S. faecalis* var. *faecalis* als Vergleich; Abkürzungen: MGDG, Monoglucosyldiglycerid, DGDG, TG DG, α -Kojibiosyl-, α -Kojitriosyldiglycerid. Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-Fertigplatte (Woelm); Entwicklung: Chloroform - Methanol - Wasser 65:25:4 (per Vol.); Färbung: Joddampf

Unzureichende Extraktion könnte daher erklären, weshalb Ishizuka und Yamakawa (15) im gleichen Stamm von *S. haemolyticus*, der in dieser Arbeit verwendet wurde, vorher nur das leicht extrahierbare Phosphoglucolipid V, nicht aber die übrigen Phosphoglucolipide fanden. Auch in *S. faecalis* wurde bislang, wahrscheinlich aus ähnlichem Grund, das Vorhandensein der Phosphoglucolipide übersehen (vgl. 4, 33).

I.2 Identifizierung der Lipide

Die im Lipidrohextrakt vorhandenen Verbindungen wurden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie identifiziert. Nach Sichtbarmachen aller Lipide mit Joddampf wurden mit den in Tabelle 2 gegebenen Gruppenreagentien (2, 3, 4) Glykolipide, Phosphoglucolipide und aminogruppenhaltige Lipide differenziert. Die selektive Anfärbbarkeit von 1, 2-Glykolgruppen mit dem Perjodat-Schiff-Reagens (Tabelle 2, Reagens 5) erleichterte die Identifizierung von Phosphatidylglycerin und erlaubte Phosphoglucolipid V und VI von den übrigen Phosphoglucolipiden zu unterscheiden.

Zur exakten Identifizierung wurden in beiden Dimensionen am Rand authentische Vergleichssubstanzen mitchromatographiert: im Falle der Identität liegt die fragliche Verbindung im Schnittpunkt der von den beiden Banden der Vergleichssubstanz parallel zum Plattenrand gezogenen Geraden. Auf dem in Abbildung 2 als Beispiel gegebenen Chromatogramm wurden Acylphosphatidylglycerin sowie die Phosphoglucolipide I, II und V im Lipidmuster von *S.haemolyticus* geortet. Außerdem wurde zur Suche nach Lysoderivaten von Diphosphatidylglycerin ein partielles Alkalihydrolysat dieses Lipids mitchromatographiert.

I.3 Lipidmuster der untersuchten Streptococcenstämmе

Die zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramme in den Abbildungen 3, 4 und 5 zeigen die Lipidzusammensetzung von *S.lactis*, *S.faecalis* var.*faecalis* und *S.haemolyticus* D-58. Die Lipidzusammensetzung von *S.faecalis* var.*zymogenes* entsprach im wesentlichen der von *S.faecalis* var.*faecalis* (Abbildung 4). Abgesehen von in geringen Mengen vorhandenen Nebenkomponten sind sämtliche Verbindungen identifiziert.

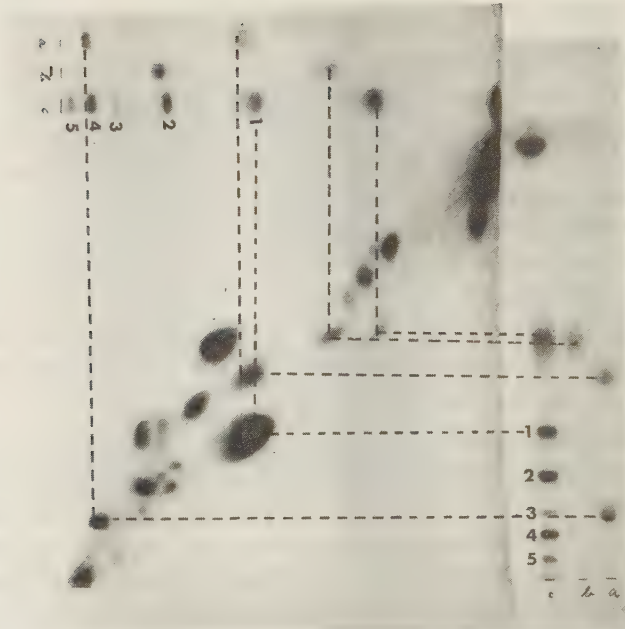


Abb. 2 Lipidextrakt aus *S. haemolyticus*: Ortung von Acylphosphatidylglycerin, Phosphoglucolipid I, II und V sowie von eventuell vorhandenen Lysoderivaten von Diphosphatidylglycerin durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie.

Vergleichssubstanzen, je Auftragstelle nach fallendem R_F -Wert geordnet:

- Phosphoglucolipid II und V;
- Phosphoglucolipid I und (nur in der zweiten Dimension aufgetragen) Monodesacyldiphosphatidylglycerin;
- Acylphosphatidylglycerin und partielles Alkalihydrolysat von Diphosphatidylglycerin: 1) Diphosphatidylglycerin, 2) Monodesacylderivat, 3, 4) die beiden isomeren Didesacylderivate, 5) Tridesacylderivat

Kieselgel-Fertigplatte (Merck), Fließmittel: 1. Dimension (senkrecht) Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 (per Vol.); 2. Dimension (waagrecht) Chloroform-Aceton-Methanol-98proz. Essigsäure-Wasser 50:20:10:10:5 (per Vol.).

Färbung: Joddampf

Tabelle 2. Verhalten der verschiedenen Streptococcenlipide bei Anfärbung auf Dünnschicht-chromatogrammen. Die Färbungen 1, 2 sowie 1, 3, 4 und 1, 5 wurden auf je einer Kieselgelplatte nacheinander durchgeführt.

Verbindungen	1	2	3	4	5
	Jod-dampf (34)	α -Naphthol-schwefel-säure (35)	Molybdän-blau-Reagens (36)	Ninhydrin-Reagens (37)	Periodat-Schiff-Reagens (38)
N-Acetylglucosaminyl diglycerid	+	-	-	-	-
Mono-, Di- und Trigluco-syldiglycerid	+	+	-	-	-
Phosphatidylglycerin	+	-	+	-	+
Diposphatidylglycerin, Acylphosphatidylglycerin	+	-	+	-	-
Aminoacylphosphatidylglycerin	+	-	+	+	-
Phosphogluco-lipid I, II, III, IV	+	+	+	-	-
Phosphogluco-lipid V, VI	+	+	+	-	+

+) Die Periodat-Schiff-Färbung kann nicht auf Kieselgelfertigplatten (Merck) ausgeführt werden, da sich hier aus unbekannter Ursache sämtliche Lipide anfärben. Geeignet sind Kieselgelplatten (Woelm) oder Kieselgelfolien (Merck und Woelm).

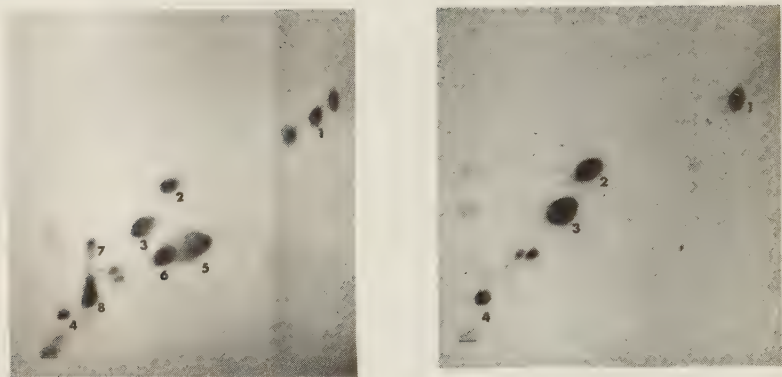


Abb. 3 Lipidmuster von *Streptococcus lactis* (zweidimensionale Dünnschichtchromatographie des Lipidrohextraktes)

- 1) Monoglucosyldiglycerid, 2) Diglucosyldiglycerid,
 3) Phosphoglucolipid III, 4) Phosphoglucolipid V,
 5) Diphosphatidylglycerin, 6) Phosphatidylglycerin,
 7, 8) Lysylphosphatidylglycerin

Platte und Fließmittel s. Abbildung 2

Färbungen: links Joddampf; rechts α -Naphthol-Schwefelsäure

Die Lipidextrakte aller Stämme enthalten Mono- und Diglucosyldiglycerid. Triglucosyldiglycerid wird in größeren Mengen nur in *S.haemolyticus* D-58 gefunden, während es in *S.faecalis* nur in Spuren auftritt und in *S.lactis* fehlt. Allen Stämmen gemeinsam ist das Vorkommen von Diphosphatidylglycerin, Phosphoglucolipid I, III und V. Phosphoglucolipid VI scheint auf Stämme von *S.faecalis* beschränkt zu sein, während Phosphoglucolipid II und IV bisher nur in *S.haemolyticus* gefunden wurden.

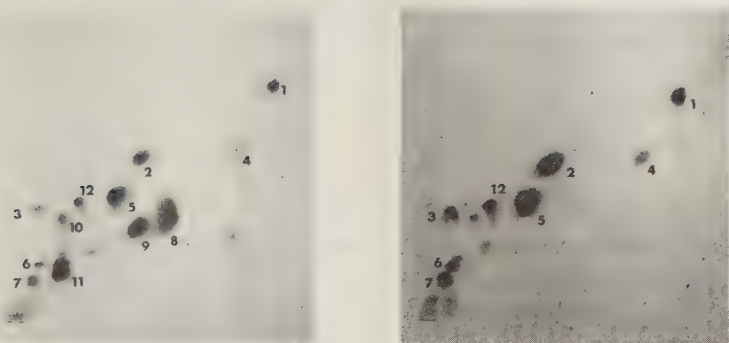


Abb. 4 Lipidmuster von *Streptococcus faecalis* var. *faecalis* (zweidimensionale Dünnschichtchromatographie des Lipidroh-extraktes)

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1) Monoglucosyldiglycerid, | 2) Diglucosyldiglycerid, |
| 3) Triglucosyldiglycerid | 4) Phosphoglucolipid I, |
| 5) Phosphoglucolipid III, | 6) Phosphoglucolipid VI, |
| 7) Phosphoglucolipid V, | 8) Diphosphatidylglycerin, |
| 9) Phosphatidylglycerin, | 10) Alanylphosphatidylglycerin, |
| 11) Lysylphosphatidylglycerin, | 12) unbekanntes aminosäurehaltiges Phosphoglucolipid |

Platte und Fließmittel s. Abbildung 2

Färbungen: links Joddampf; rechts α -Naphthol-Schwefelsäure

Phosphatidylglycerin ist im Extrakt von *S. haemolyticus* im Gegensatz zu den beiden anderen Stämmen nicht direkt nachweisbar; die geringen vorhandenen Mengen traten erst nach Fraktionierung des Extraktes in Erscheinung. Aminoacylderivate von Phosphatidylglycerin wurden in *S. faecalis* und *S. lactis* gefunden. Ob *S. haemolyticus* zur Synthese befähigt ist, bleibt offen, da die Bakterien nur unter laufender Neutra-

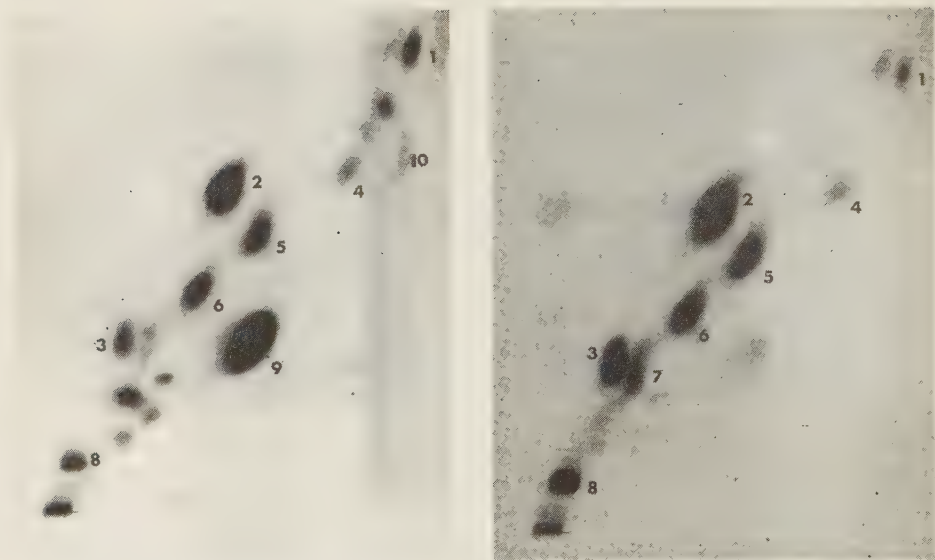


Abb. 5 Lipidmuster von *Streptococcus haemolyticus* (zweidimensionale Dünnschichtchromatographie des Lipidrohextraktes)

- | | |
|--|---------------------------|
| 1) Monoglucosyldiglycerid, | 2) Diglucosyldiglycerid, |
| 3) Triglucosyldiglycerid, | 4) Phosphoglucolipid I, |
| 5) Phosphoglucolipid II, | 6) Phosphoglucolipid III, |
| 7) Phosphoglucolipid IV, | 8) Phosphoglucolipid V |
| 9) Diphosphatidylglycerin (mit Spur Phosphatidylglycerin), | |
| 10) Acylphosphatidylglycerin | |

Platte und Fließmittel s. Abbildung 2

Färbungen: links Joddampf; rechts α -Naphthol-Schwefelsäure

lisation gezüchtet wurden und Aminoacylderivate von Phosphatidylglycerin erst während des durch die gebildete Milchsäure verursachten pH-Abfalls synthetisiert werden (vgl. 31). In Übereinstimmung damit ließen auch die *S. faecalis* Stämme Aminoacyl-Phosphatidylglycerin vermissen, als im Hauptver-

such zur Erhöhung der Lipidausbeute in neutralem Milieu gezüchtet wurde.

Acylphosphatidylglycerin, bisher nur in *Salmonella typhimurium* nachgewiesen (39), kommt in geringer Menge auch in *S. haemolyticus* und *S. faecalis* vor.

II. TRENNUNG DER LIPIDE

}

II.1 Prinzip und Wahl der Methoden

Für die Fraktionierung der in dieser Arbeit eingesetzten Mengen an Rohlipid (ca. 4 - 5 g pro Bakterienstamm) kam nur Säulenchromatographie in Frage. Es wurden Trennungen der Rohextrakte sowohl über Kieselgel als auch über Anionenaustauscher-Cellulose (DEAE-Cellulose) durchgeführt. Im folgenden werden Bindungseigenschaften und Trennleistungen dieser Säulen beschrieben.

II.1.1 Trennleistung von Kieselgel

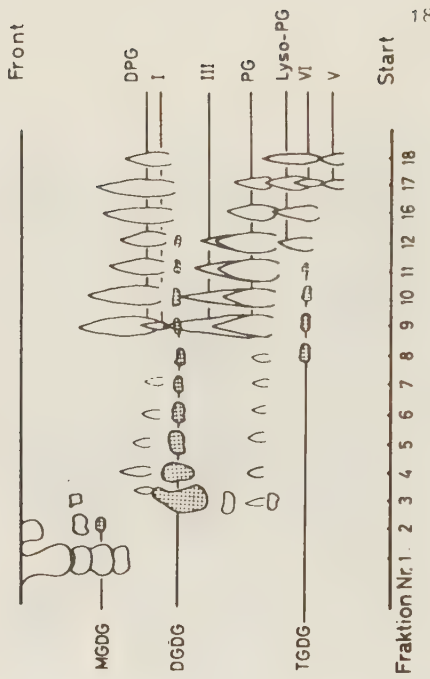
Die Lipide werden in einem wenig polaren Lösungsmittel, meist in Chloroform, auf die Säule gebracht. Für die Adsorption der Lipide sind Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen verantwortlich (40, 41). Wasserstoffbrückenbindung erfolgt über O=Si-, Si-O-Si- und HO-Si- Gruppen des Kieselgels; Ionenaustauschreaktionen finden durch Protonentransfer von HO-Si-Gruppen auf Protonenacceptorgruppen der Lipide (Phosphat, Sulfat, Aminogruppen) statt (40, 41, 42). Ein von Vorbeck und Marinetti entwickeltes Elutionsprogramm schien für unsere Trennprobleme als geeignet, da es die Trennung von Glyko- und Phospholipiden ermöglicht.

Eine eigene Trennung ist als Beispiel in Abbildung 6 gegeben: 835 mg Lipidrohextrakt aus *Streptococcus*

Elutionsfolge:

Frkt. Nr.	Elutionsgemisch	(v/v)	Frkt.-Vol.
1	Chloroform	1:0	200 ml
2	Chloroform-Aceton	1:1	200 ml
3-7	Aceton	1:0	je 100 ml
8	Aceton-Methanol	96:4	100 ml
9-14	Chloroform-Methanol	9:1	je 100 ml
15	Chloroform-Methanol	4:1	100 ml
16	Chloroform-Methanol	4:1	100 ml
17	Chloroform-Methanol	3:1	100 ml
18	Chloroform-Methanol	2:1	100 ml
19	Chloroform-Methanol	1:1	200 ml
20	Chloroform-Methanol	1:2	200 ml

Abb. 6: Erstfraktionierung eines Lipidohextraktes aus *Streptococcus faecalis* var. zymogenes durch Säulenchromatographie über Kieselgel. Der Lipidohextrakt (835 mg) wurde in 10 ml Chloroform gelöst und auf eine mit bei 110 °C aktiviertem Kieselgel Mallinckrodt (12 Stunden) gefüllte Säule gebracht. Säulenfüllmasse: 60 g; Säulendurchmesser: 4,8 cm; Säulenhöhe: 7 cm; Bettvolumen 100 ml; Durchflußgeschwindigkeit während der Elution: 1,5 ml/min. Elutionsfolge und Größe der Fraktionen sind in obiger Tabelle wiedergegeben. Dünnschichtchromatogra-



phische Prüfung der Fraktionen: Kieselgel G (Merck), Platte selbstgestrichen, 30 min bei 110 °C aktiviert. Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 65:35:8 (p.Vol.) Färbungen: a) Joddampf für alle Lipide, b) α-Naphthol-Schwefelsäure für kohlenhydrathaltige Lipide. Phosphathaltige Lipide wurden auf einem zweiten Chromatogramm sichtbar gemacht mit Molybdänblau-Reagenz. Abkürzungen: MGDG, DGDG, TGDG, Mono-, Di-, Triglycosyldiglycerid; DPG, PG, Diphosphatidylglycerin, Phosphatidylglycerin; I, III, VI, V, Phosphoglucolipide.

faecalis var. zymogenes wurden über eine Kieselgelsäule (60 g Kieselgel; Säule 7 cm x 4,8 cm) fraktioniert. Das Ergebnis läßt sich wie folgt zusammenfassen:

- (i) Mit Chloroform wurden vorwiegend wenig polare nicht näher identifizierte Verbindungen (Pigmente) eluiert (Fraktion 1).
- (ii) Mit Chloroform-Aceton (1:1; v/v) und Aceton erschienen nacheinander Mono- und Diglucosyldiglycerid (Fraktion 2 - 8). Di- und Triglucosyldiglycerid waren jedoch auch noch in den phosphatidhaltigen Fraktionen (9 - 12) nachweisbar.
- (iii) Die Phospholipide wurden mit einem stufenweisen Gradienten von Methanol in Chloroform eluiert. Ihre Trennung war unbefriedigend: Diphosphatidylglycerin war in allen Fraktionen vorhanden, Phosphoglucolipid I und III erschienen zusammen (Fraktion 9) und Phosphoglucolipid III sowie Phosphatidylglycerin wiesen eine breite Überschneidung auf (Fraktion 9 - 12) .
- (iv) Bessere Trennergebnisse ließen sich durch Veränderung von Beladung und Säulenmaßen nicht erzielen.

Die schlechte Trennung der anionischen Lipide dürfte wenigstens teilweise darauf zurückzuführen sein, daß diese aus biologischem Material als Salze ein- und zweiwertiger Kationen extrahiert werden. Von diesen werden K^+ und Na^+ am Kieselgel langsam und unvollständig gegen H^+ ausgetauscht, woraus eine Peakverbreiterung resultiert, da die Säureform vor den Salzen monovalenter Kationen erscheint (42, 44). Salze mit divalenten Kationen unterliegen keinem Ionenaustausch und werden noch vor der Säureform eluiert (45).

Kieselgelsäulen mit Natriumionen¹⁾(41, 42, 46) oder Ammoniumionen¹⁾(41) sollen bessere Trennergebnisse bringen, da hierbei der oben erwähnte Ionenaustausch nicht auftritt. Erstere wurden in der vorliegenden Arbeit für die Endreinigung bestimmter anionischer Lipide eingesetzt (vgl. Seite 41, 45, 52).

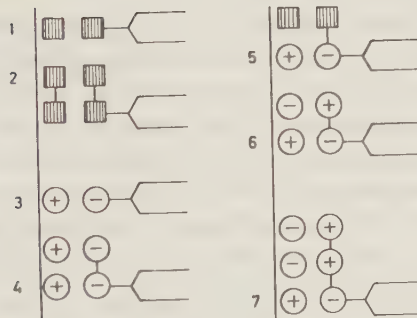
II.1.2 Trennleistung von DEAE-Cellulose (Acetatform) (41, 46, 47)

Fraktionierung von Lipidrohextrakten an Anionenaustauschern, vorzugsweise an DEAE-Cellulose, ist seit 1961 bekannt (40). Anionische Lipide werden durch Ionenaustausch über elektrostatische Wechselwirkungen fixiert. Sie lassen sich nur mit Lösungsmitteln eluieren, die Säuren, Basen oder Salze enthalten und können auf diese Weise von nicht-ionischen und zwitterionischen Lipiden abgetrennt werden.

Anfänglich nahm man an, daß eine Bindung von nicht-ionischen Lipiden über Wasserstoffbrücken auch in Lösungsmitteln von geringer Polarität keine Rolle spiele und sich für die Trennung nicht nutzen ließe (40). Diese Ansicht wurde revidiert, als auf DEAE-Cellulose mit einem stufenweisen Gradienten von Methanol in Chloroform Cerebrosid und Ceramidoligosaccharide (41) sowie Mono- und Dihexosyldiglyceride (48) getrennt werden konnten. Somit ist die Lipidtrennung auf DEAE-Cellulose eine Kombination von Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie. Die wichtigsten Wechselwirkungen sind in Schema 1 zusammengestellt.

1) Man nimmt an, daß hierbei am Kieselgel Protonen durch Na^+ oder NH_4^+ ersetzt werden (vgl. l.c. 42).

Während die Ionenaustauschchromatographie vorwiegend zur Gruppentrennung in neutrale, zwitterionische und anionische Lipide benutzt wurde (46), verwendeten Hendickson und Ballou (49) erstmals einen kontinuierlichen Ammoniumacetat-Gradienten, um in Lipidohextrakten aus Hirn anionische Phosphatide nach Zahl ihrer negativen Ladungen zu fraktionieren (Typ 3 und 4 in Schema 1). Dabei gelang die Trennung von Mono-,



Schema 1: Schematische Darstellung der Bindungstypen bei Säulenchromatographie auf DEAE-Cellulose (in Anlehnung an (41)). $\oplus$, $\ominus$ positive und negative Ladungen, $\square$ polare, nicht-ionische (meist Hydroxyl-) Gruppen.

Di- und Triphosphoinosit. Ein weiteres Beispiel ist die jedoch nur teilweise gelungene Trennung von Acylphosphatidylglycerin, Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin, die ebenfalls mit einem kontinuierlichen Ammoniumacetat-Gradienten durchgeführt wurde (39). Schema 1 entsprechend erscheinen die drei Verbindungen in der obigen Reihenfolge im Eluat.

Ausgehend von diesen Ergebnissen versuchten wir die Unterschiedlichkeit der in Schema 1 dargestellten Bindungstypen noch weitergehend zur Fraktionierung innerhalb der Gruppen zu nutzen. Wir verwendeten zur Elution diskontinuierliche Gradienten, da sich hierbei unter laufender Kontrolle des Eluats Überschneidungen leichter vermeiden lassen.

Das Ergebnis eines Vorversuches, in dem 1,57 g Rohlipid aus Streptococcus B über DEAE-Cellulose, Acetatform (Säule 19,5 cm x 2,4 cm) fraktioniert wurde, ist in Abbildung 7 zusammengestellt (W. Fischer, unveröffentlicht). Die Fraktionen 1 - 6 wurden mit einem Stufengradienten von Methanol in Chloroform eluiert, ab Fraktion 7 wurde ein Stufengradient von Ammoniumacetat in Chloroform-Methanol (2:1; v/v) eingesetzt.

Das Ergebnis läßt sich, wie folgt, zusammenfassen:

- (i) Wie in der Literatur beschrieben (41, 46, 47), werden polare nicht ionische und zwitterionische Lipide durch einen Stufengradienten von Methanol in Chloroform getrennt. Die Elutionsfolge ist: Monoglucosyldiglycerid, Diglucosyldiglycerid, Lysylphosphatidylglycerin (Bindungstypen 1, 2 und 7, Schema 1).
- (ii) Bereits bei der Fraktionierung des Rohextraktes läßt sich durch einen Stufengradienten an Ammoniumacetat eine gute Vorfraktionierung der

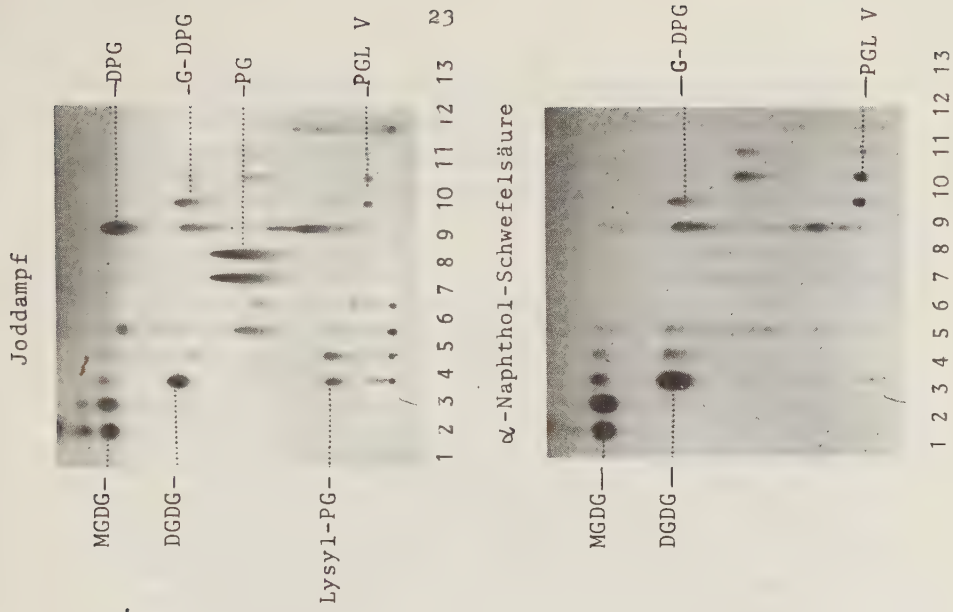
Abb. 7: Erstfraktionierung eines Lipidrohextraktes (1,57 g) aus Streptococcus, Serogruppe B durch Säulen- chromatographie über DEAE-Cellulose, Acetatform. Säulen- füllmasse: 15 g; Füllhöhe: 19 cm; Säulendurchmesser: 2,5 cm; Bettvolumen: 70 ml; Durchfließgeschwindigkeit des Elutionsmittels: 2 ml/min. Das Lipid wurde in 10 ml Chloroform gelöst auf die Säule gegeben.

Elutionsfolge:

Fraktion	C-M Gemisch (v/v)	NH ₄ Ac Gehalt %(g/v)	Frkt. Volumen (ml)	Lipid- Gewicht (g)

1	1:0	-	300	337
2	97:3	-	300	204
3	9:1	-	300	464
4	9:1	-	300	36
5	2:1	-	300	69
6	2:1	-	200	58
7	2:1	0,05	300	26
8	2:1	0,10	300	267
9	2:1	0,20	200	64
10	2:1	0,20	200	19
11	2:1	0,40	200	12
12	2:1	0,40	200	43
13	2:1	0,80	400	47

Dünnschichtchromatographie der Fraktionen:
Kieselgel-Fertigplatte (Woelm), 30 min ak-
tiviert bei 110 °C. Fließmittel: Chloroform-
Methanol-Wasser 65:25:4 (p.Vol.). Auf einem
zweiten Chromatogramm wurde mit Ninhydrin-Re-
agenz auf aminosäurehaltige, mit Molybdänblau-
Reagenz auf phosphathaltige Lipide geprüft.
Abkürzungen: C-M, Chloroform-Methanol; NH₄Ac
Ammoniumacetat; MGDG, DGDG, Mono-, Diglucosyl-
diglycerid; DPG, PG, Diphosphatidylglycerin,
Phosphatidylglycerin; LPG, Lysyl-Phosphatidyl-
glycerin; G-DPG, Glucosyl-Diphosphatidylglycerin;
PGL V, Phosphoglucolipid V.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

anionischen Lipide erzielen. Die Elutionsfolge ist: Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin), Glucosyl-Diphosphatidylglycerin, Glycerophosphoryldigluco-syldiglycerid (Phospho-glucolipid V).

- (iii) Die Trennung der anionischen Lipide erfolgt zunächst nach Zahl der negativen Ladungen im Molekül, wie die Trennung von Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin zeigt (Bindungstyp 4 und 6, Schema 1).
- (iv) Obwohl die Elution mit einem polaren Elutionsmittel erfolgte (Chloroform-Methanol, 2:1, v/v), werden die Bindungseigenschaften der anionischen Lipide durch Hydroxylgruppen modifiziert (Bindungstyp 2 und 5, Schema 1). Dafür spricht die teilweise Trennung von einfachem und glucosyliertem Diphosphatidylglycerin. Ein zweites Beispiel ist die vollständige Trennung von Phosphatidylglycerin und Glycerophosphoryldigluco-syldiglycerid, dessen Struktur sich formal von der des Phosphatidylglycerins nur durch Einschub von zwei Glucosylresten zwischen Diglycerid- und Glycerinphosphat-Anteil unterscheidet (vgl. Strukturformeln, Seite 1 u. 2). Es wird trotz einfach negativer Ladung erst nach dem doppelt negativ geladenen Diphosphatidylglycerin eluiert. Für dieses Verhalten dürfte die "offene" Struktur von Glycerophosphoryldigluco-syldiglycerid mitverantwortlich sein, das die Fettsäuren am einen Molekülende trägt und daher eine wenig abgeschirmte polare Kopfgruppe besitzt.

- (v) Ein Vergleich zwischen Abbildung 6 und Abbildung 7 macht deutlich, daß die Fraktionierung des Rohextraktes über DEAE-Cellulose zu einer wesentlich besseren Vortrennung führt als Säulentrennung über Kieselgel. Raschere Elution und höhere Beladbarkeit sind weitere Vorteile.

II.1.3 Der Einfluß der Kettenlänge der Fettsäuren auf das Trennverhalten polarer Lipide

Wie Tabelle 3 zeigt, erscheinen bei Elution von Diglucosyldiglycerid von einer DEAE-Cellulose-Säule zuerst Molekülspezies mit einem hohen Gehalt an langkettigen und niedrigen Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren, während die anschließend eluierten Spezies umgekehrte Verhältnisse in der Fettsäurezusammensetzung aufweisen. Ein entsprechendes Bild ergab sich bei der Elution von Phosphatidylglycerin aus einer Kieselgelsäule (Tabelle 3). Eine detailliertere Analyse, die bei Reinigung eines Monoglucosyldiglycerids über eine Kieselgelsäule, durchgeführt wurde, bestätigt und erweitert diese Beobachtung (Abbildung 8).

Die Tatsache, daß bei Elution von Glyko- und Phospholipiden sowohl aus Kieselgel- als auch von DEAE-Cellulose-Säulen Molekülspezies mit länger-kettigen vor solchen mit kurzkettigen Fettsäuren eluiert werden, legt den Schluß nahe, daß die Fettsäuren je nach Kettenlänge mehr oder weniger die polare oder ionische Wechselwirkung des Lipidkopfstücks mit der stationären Phase behindern. Da Lipide stets aus einer Vielzahl von Spezies bestehen, erklärt obige Beobachtung, daß die Elution von Lipiden bei der Säulenchromatographie nicht wie bei anderen Verbindungen scharf, sondern in relativ breiten Peaks erfolgt, wodurch die Trennung von Lipiden mit wenig unterschiedlicher Po-

Tab.3 Fraktionierung von Lipiden nach Kettenlänge ihrer Fettsäuren bei Chromatographie über DEAE-Cellulose und Kieselgel (W. Fischer, unveröffentlicht). Diglucosyldiglycerid (DGDG) wurde in zwei Fraktionen mit Chloroform-Methanol 9:1 (v/v) von einer DEAE-Säule eluiert, Fraktion 4 - 11 von Phosphatidylglycerin wurde aus einer Kieselgelsäule mit Chloroform-Methanol 9:1 bis 3:1 (v/v), Fraktion 12 mit Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) eluiert. Werte in Mol%.

	12:0	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	19 _{Cy}	kurz- kettige Fett- säuren	lang- kettige Fett- säuren
DGDG, Fraktion 1 (71 mg)	1,6	8,6	1,2	33,5	17,5	6,0	30,2	1,3	62,4	37,5
DGDG, Fraktion 2 (64 mg)	9,9	17,3	n.b.	38,9	17,5	3,3	13,0	n.b.	83,6	16,3
PG, Fraktion 4-11 (238 mg)	-	1,0	-	21,1	13,0	24,7	31,4	8,7	35,1	64,8
PG, Fraktion 12 (78 mg)	1,2	5,8	1,6	32,0	18,1	16,9	18,5	5,8	58,7	41,2

+) kurzkettige Fettsäuren: Dodekan- bis Hexadecensäure; langkettige Fettsäuren: Oktadecan- bis C₁₉-Cyclopropanensäure

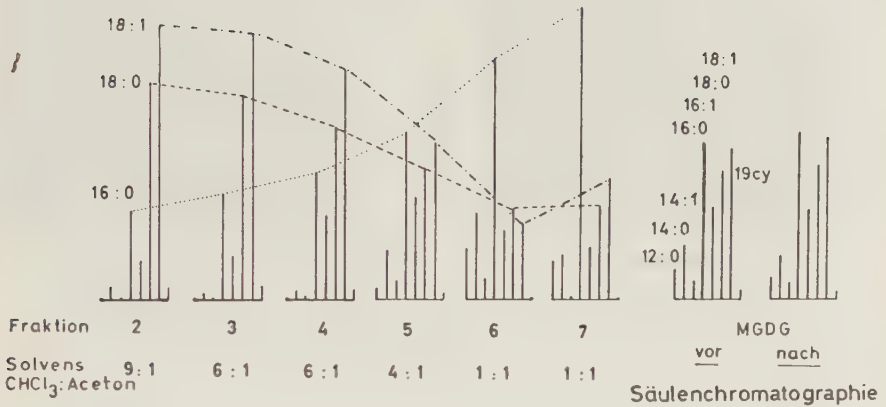


Abb.8: Fraktionierung von Monoglucosyldiglycerid nach Kettenlänge der Fettsäuren bei Chromatographie über eine Kieselgelsäule. Zur Abtrennung der in der Monoglucosyldiglyceridfraktion nach Trennung über DEAE-Cellulose, Acetatform, vorhandenenen Pigmente (vgl. Abbildung 2) wurde die Elution mit einer sehr geringen Polarität durchgeführt. Etwa je 35 % des Monoglucosyldiglycerids waren in Fraktion 4 und 5 enthalten (W. Fischer unveröffentlicht).

larität erschwert wird. Für die vergleichende Analyse der Fettsäurezusammensetzung der verschiedenen Lipide eines Bakteriums ergibt sich daraus die Forderung, daß bei der Reinigung überschneidende Fraktionen nicht verworfen werden dürfen; andernfalls durch Verlust bestimmter Spezies keine repräsentative Fettsäurezusammensetzung mehr erhalten wird (vgl. Abbildung 8).

II.2 Isolierung der Lipide aus Streptococcus haemolyticus D-58

Im folgendem wird die Isolierung der polaren Lipide aus *S. haemolyticus* D-58 beschrieben. Isoliert wurden: Acylphosphatidylglycerin, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin, α -Glucosyldiglycerid, N-Acetyl- α -D-glucosaminyldiglycerid, α -Kojibiosyldiglycerid, α -Kojitriosyldiglycerid, sowie die Phosphoglucolipide I, II, III, IV, V. Damit wurden alle im Rohextrakt nachweisbaren polaren Lipide, ausgenommen Pigmente und Lyso-Verbindungen, in chromatographisch reiner Form erhalten.

Spezielle Trennprobleme, die bei der Reinigung bestimmter Lipide aus den übrigen Bakterienstämmen auftraten, werden in Abschnitt II,3 (Seite 49) behandelt.

II.2.1 Fraktionierung des Lipidrohextraktes über DEAE-Cellulose (Acetatform)

Das Gesamtlipid war durch fünfmalige Extraktion der Bakterien gewonnen worden (vgl. Seite 9). Der 1. Extrakt (2,95 g) wurde getrennt aufbereitet, die Extrakte 2 bis 5 zur Säulenchromatographie vereinigt (1,84 g). Die Fraktionierung erfolgte über die DEAE-Cellulose-Säulen, wobei über Säule 1 und 2 je die Hälfte des 1. Extraktes, über Säule 3 und 4 je die Hälfte der vereinigten Extrakte 2 - 5 chromatographiert wurden.

Abb. 9: Erstfraktionierung eines Lipidhextraktes aus *Streptococcus haemolyticus* durch Säulenchromatographie über DEAE-Cellulose, Acetatfom. Auf die Säule wurden 1,47 g Lipidextrakt gegeben. Beschriftung der Säule, Durchführung der Elution sowie Säulenmaße sind in Legende zu Abb. 7 beschrieben.

Elutionsfolge:

Fraktion	C-M		NH ₄ Ac		Frkt.		Lipid-Gewicht (mg)
	Gemisch (v/v)		Gehalt % (g/v)		Volumen (ml)		
1	1:0	-	-	-	300	-	700
2	97:3	-	-	-	300	-	40
3	9:1	-	-	-	300	-	350
4	3:1	-	-	-	300	-	35
5	2:1	0,01	0,01	0,01	300	-	53
6	2:1	0,01	0,01	0,01	150	-	24
7	2:1	0,05	0,05	0,05	300	-	7
8	2:1	0,05	0,05	0,05	300	-	54
9	2:1	0,10	0,10	0,10	300	-	24
10	2:1	0,20	0,20	0,20	300	-	110
11	2:1	0,40	0,40	0,40	300	-	32
12	2:1	0,40	0,40	0,40	300	-	5

Dünnschichtchromatographische Prüfung der Fraktionen: vgl. Legende zu Abb. 7. Bei Prüfung mit Ninhydrin-Reagenz wurden keine aminosäurehaltigen Lipide gefunden. Abkürzungen: C-M, Chloroform-Methanol; NH₄Ac, Ammoniumacetat; MGDG, DGDG, TGDG, Mono-, Di-, Triglycerid; DPG, PG, Di-phosphatidylglycerin, Phosphatidylglycerin; Acyl-PG, Acylphosphatidylglycerin; PGL, Phosphogluco-lipid

Joddampf



29

α-Naphthol-Schwefelsäure



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Die über Säule 1 erreichte Fraktionierung geht aus Abbildung 9 hervor; die übrigen drei Säulen ergaben im wesentlichen dieselbe Trennung.

Das Ergebnis bestätigt und erweitert die aus dem Vorversuch (II, 1.2, Seite 22) gezogenen Schlußfolgerungen:

- (i) Glykolipide werden nach Anzahl ihrer Hexosyleinheiten durch steigende Polarität des Elutionsmittels vollständig getrennt. Trigluco-syldiglycerid wird erwartungsgemäß nach Digluco-syldiglycerid eluiert.
- (ii) Der anschließend eingesetzte Stufengradient an Ammoniumacetat führt zu einer weitgehenden Trennung der anionischen Phospholipide.
- (iii) Verbindungen mit einer negativen Ladung (Acylphosphatidylglycerin, Phosphogluco-lipid I - IV) werden vor solchen mit zwei negativen Ladungen (Diphosphatidylglycerin) eluiert. Phosphogluco-lipid V ist wieder die einzige Ausnahme, da es wie im Vorversuch nach Diphosphatidylglycerin erscheint.
- (iv) Auch innerhalb der Verbindungen mit einer Phosphodiestergruppe ist eine Trennung möglich: Für die Trennung von Phosphogluco-lipid I, III und IV ist offensichtlich die Anzahl der Glucosylreste verantwortlich, was den Einfluß der Polarität auf das Elutionsverhalten bestätigt. In die gleiche Richtung weist die vollständige Trennung von Acylphosphatidylglycerin und Phosphatidylglycerin.
- (v) Auffallend ist die praktisch vollständige Trennung von Phosphogluco-lipid II und III, die sich nur durch die Stellung des Phosphatidylrestes am α -Kojibiosyldiglycerid unterscheiden (Strukturformeln, Seite 1 u. 2). Sitz des Phosphatidyl-

restes an der äußeren Glucose reduziert die Polarität offensichtlich stärker als bei Bindung an der inneren Glucose, was sich auch bei der Dünnschichtchromatographie zeigt. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß die Verteilung der Fettsäurereste im Molekül die Wechselwirkung zwischen Lipid und stationärer Phase beträchtlich und auf für die Trennung nutzbare Weise beeinflussen kann.

II.2.2 Weiteres Vorgehen

Diejenigen Fraktionen der vier DEAE-Säulen, die dieselben Lipide enthielten, wurden vereinigt. Aus ihnen erfolgte die Isolierung der Einzellipide, die in den folgenden Abschnitten beschrieben wird.

II.2.3 Trennung von Glucosyl- und N-Acetylglucosaminyl-diglycerid

Die beiden Verbindungen wurden zusammen aus den DEAE-Säulen in der jeweiligen Fraktion 2 eluiert (Abbildung 9). Ihre Trennung erfolgte, wie von Ishizuka (50) beschrieben, durch Säulenchromatographie auf Kieselgel. Säulenprogramm und Trennergebnis sind in Schema 2 zusammengefaßt. Wenig polare kohlenhydratfreie Komponenten wurden mit Chloroform und Chloroform-Aceton (5:1, 4:1, per Vol.) abgetrennt. Dann wurden mit steigendem Aceton-Anteil mit einer geringfügigen Überschneidung nacheinander Glucosyl- und N-Acetylglucosaminyl diglycerid eluiert.

Die Säuleneluate 5 und 6 (Schema 2) wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie nachgereinigt;¹⁾

¹⁾ Kieselgel Fertigplatten (Merck). Solvens: Chloroform-Methanol-25 % Ammoniakwasser (80:10:0,5:0,5 p.Vol.) Partielle Desacylierungen konnten hierbei nicht beobachtet werden.

72 mg Lipid

1	Chloroform	160 ml	
2	Chloroform-Aceton	5:1 160 ml	wenig polare kohlenhydratfreie Verbindungen
3	Chloroform-Aceton	4:1 150 ml	
4	Chloroform-Aceton	3:1 150 ml	Glucosyldiglycerid 16 mg
5	Chloroform-Aceton	2:1 150 ml	Glucosyldiglycerid N-Acetylglucosami- nyldiglycerid 3 mg
6	Chloroform-Aceton	1:1 150 ml	N-Acetylglucosami- nyldiglycerid Verbindung X 34 mg
7	Chloroform-Methanol	2:1 150 ml	keine kohlenhydrat- haltigen Lipide

Schema 2: Trennung der vereinigten Monohexosylfraktionen durch Säulenchromatographie auf Kieselgel. 72 mg vereinigte Monohexosyldiglyceridfraktionen (vgl. Fraktion 2, Abb. 9); 10 g Kanto-Kakagu Kieselgel (Säulendurchmesser 2,2 cm; Füllhöhe 10 cm). Ab 3 wurde in Fraktionen von 24 ml gesammelt. Verbindung X, nicht näher charakterisiertes, glucosehaltiges Lipid (ca. 6 mg); möglicherweise handelt es sich um ein Dihexosyldiglycerid mit einem dritten, an eine Hydroxylgruppe der Glucose gebundenen Acylrest (22).

dabei wurden die beiden Verbindungen aus der Überschneidungsfraction (5, Schema 2) getrennt und N-Acetylglucosaminylidiglycerid von Verbindung X (6, Schema 2) befreit.

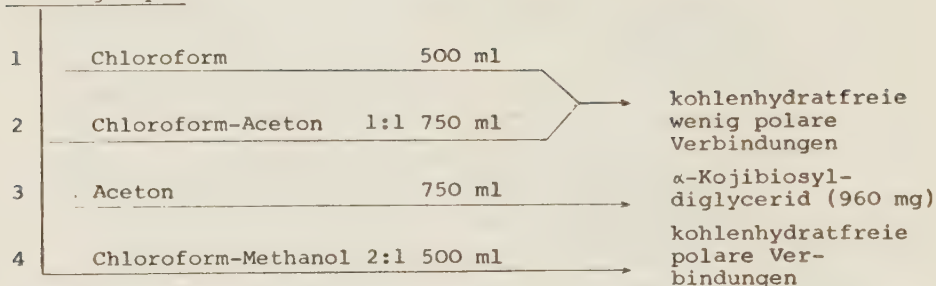
II.2.4 Reinigung von α -Kojibiosyldiglycerid und α -Kojitriosyldiglycerid

Die beiden Glykolipide waren bei Chromatographie des Rohextraktes aus den DEAE-Cellulose-Säulen bereits getrennt erhalten worden (Abbildung 9, Fraktion 3 u. 4). Als Verunreinigungen waren teils polare, teils weniger polare, meist kohlenhydratfreie Verbindungen enthalten. Diese wurden, wie in Schema 3 und 4 dargestellt, durch Säulenchromatographie über Kieselgel abgetrennt. Die kohlenhydrathaltigen Verunreinigungen waren in so geringer Menge vorhanden, daß auf eine nähere Charakterisierung verzichtet wurde.

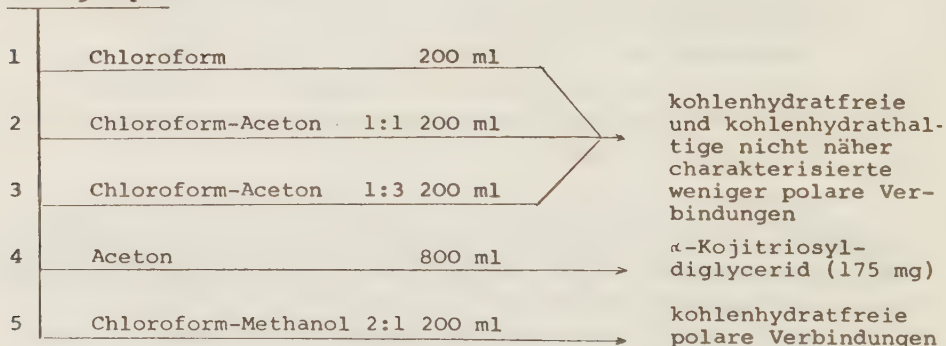
II.2.5 Reinigung von Acylphosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid I und II

Bei Fraktionierung des Rohextraktes über die in II.2.1 beschriebenen vier DEAE-Cellulose-Säulen waren diese drei anionischen Phospholipide mit der niedrigsten Salzkonzentration gemeinsam eluiert worden, wobei zwei Fraktionen erhalten wurden, von denen die eine mehr, die andere weniger Acylphosphatidylglycerin enthielt (Abbildung 9, Fraktion 5 u. 6).

Trennung der drei Lipide über Kieselgelsäulen schien wenig aussichtsreich, da die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit neutralen Fließmitteln nur unvollständige Trennung zeigte und sich das Auflösungsvermögen beim Übergang auf die Säule verschlechtert. Obwohl präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit einem sauren Fließmittel (z.B. Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser 50:20:10:10:5, per Vol.) möglich gewesen wäre, zogen wir eine säulen-

1100 mg Lipid

Schema 3: Reinigung von α-Kojibiosyldiglycerid durch Säulen-
chromatographie auf Kieselgel. 1100 mg Lipid aus den α-Kojibiosyl-
diglyceridhaltigen Fraktionen der vier DEAE-Säulen (vgl. Abb. 9
Fraktion 3). 200 g Kieselgel, Mallinckrodt, 100 mesh (Säulen-
durchmesser 7,2 cm, Füllhöhe 8 cm). Gesammelt wurden Fraktionen
von 250 ml.

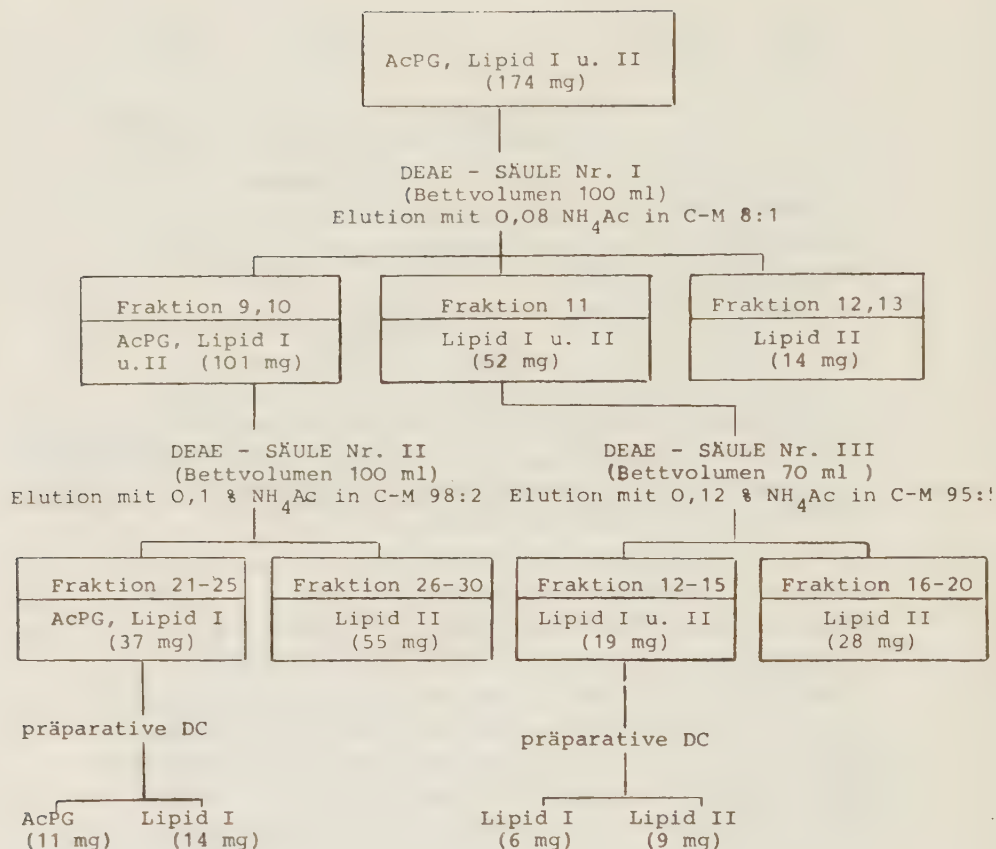
205 mg Lipid

Schema 4: Reinigung von α-Kojitriosyldiglycerid durch Säulen-
chromatographie auf Kieselgel. 205 mg Lipid aus den α-Kojitriosyl-
diglyceridhaltigen Fraktionen der vier DEAE-Säulen (vgl. Abb. 9,
Fraktion 4). 100 g Kieselgel Mallinckrodt, 100 mesh (Säulendurch-
messer 4,8 cm, Füllhöhe 13 cm). Bei 3 und 4 wurde in Fraktionen
von 25 ml gesammelt.

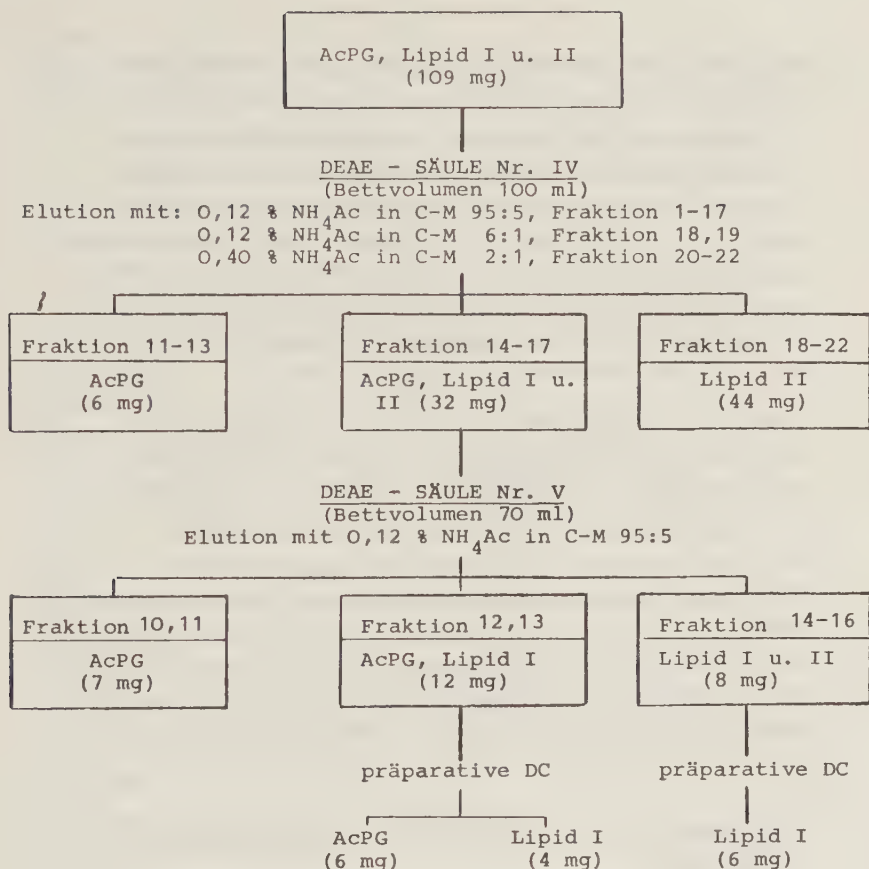
chromatographische Vorfraktionierung wegen der relativ großen Lipidmenge (283 mg) vor.

Die Fraktionierung erfolgte über insgesamt fünf Säulen mit DEAE-Cellulose (Acetatform), deren Elutionsprogramm und Trennergebnis in Schema 5 und 6 zusammengefaßt ist. Diejenige der beiden Ausgangsfractionen, die weniger Acylphosphatidylglycerin enthielt (vgl. oben), wurde nach Schema 5, die an Acylphosphatidylglycerin /reichere nach Schema 6 fraktioniert.

Da sich die drei zu trennenden Phospholipide (Acylphosphatidylglycerin, Phosphoglucolipid I und II) in der Zahl ihrer Hydroxylgruppen unterscheiden, suchten wir diese Unterschiede für die Trennung dadurch zu nutzen, daß wir ein Elutionsmittel von geringer Polarität einsetzten. Mit Chloroform-Methanol, 8:1 (v/v, enthaltend 0,08 % Ammoniumacetat) wurde eine sehr unvollständige Trennung erzielt, wobei es nicht einmal gelang, Phosphoglucolipid II in größerem Umfang abzutrennen (Schema 5, Säule Nr. I). Wie Schema 5 (Säule Nr. III) zeigt, gelang eine bessere Abtrennung von Phosphoglucolipid II mit Chloroform-Methanol 95:5 (v/v, enthaltend 0,12 % Ammoniumacetat); eine vollständige Abtrennung wurde jedoch erst mit Chloroform-Methanol 98:2 (v/v, enthaltend 0,1 % Ammoniumacetat) erzielt (Schema 5, Säule Nr. II). Selbst bei dieser geringen Polarität konnten auf Säule Nr. II Acylphosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid I nicht getrennt werden, wenngleich eine Anreicherung des weniger polaren Acylphosphatidylglycerins in den vorderen Fraktionen 21, 22 erfolgte. Immerhin wurden durch diese drei säulenchromatographischen Trennungen 97 mg Phosphoglucolipid II (56 % der Lipid-Ausgangsmenge) in reiner Form erhalten. Die Lipide



Schema 5: Trennung von Acylphosphatidylglycerin sowie Phosphoglucolipid I und II durch Kombination von Säulenchromatographie über DEAE-Cellulose, Acetat und präparative Dünnschichtchromatographie. 174 mg Lipid aus denjenigen Fraktionen der vier DEAE-Säulen, die weniger Acylphosphatidylglycerin und mehr Phosphoglucolipid I und II enthielten (Abb.9, Fraktion 6). Säulenchromatographie: DEAE-Cellulosesäule Nr. I und II (Füllmenge: 15 g, Durchmesser: 2,2 cm, Füllhöhe: 18 cm). Gesammelt wurden Fraktionen von 100 ml. Präparative Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-Fertigplatten (Merck), Entwicklung: Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser 50:20:10:10:5 (p. Vol.). Anfärbung und Elution der Verbindungen vgl. experimenteller Teil (S.148). Abkürzungen: NH_4Ac , Ammoniumacetat; AcPG, Acylphosphatidylglycin; Lipid I und II, Phosphoglucolipid I und II; C, Chloroform; M, Methanol.



Schema 6: Trennung von Acylphosphatidylglycerin sowie Phosphogluco lipid I und II durch Kombination von Säulenchromatographie über DEAE-Cellulose, Acetat und präparative Dünnschichtchromatographie. 109 mg Lipid aus denjenigen Fraktionen der vier DEAE-Säulen, die mehr Acylphosphatidylglycerin enthielten (Abb. 9, Fraktion 6). Säulenchromatographie: DEAE-Cellulose-Säule Nr. IV wie Nr. I und II; Nr. V wie Nr. III in Schema 5. Gesammelt wurde in Fraktionen von 100 ml. Präparative Dünnschichtchromatographie und Abkürzungen wie in Schema 5

der noch verbliebenen Mischfraktionen wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie getrennt.

Auf Säule Nr. IV (Schema 6) wurde aus dem Ausgangslipidgemisch etwa ein Drittel des vorhandenen Acylphosphatidylglycerins und fast das gesamte Phosphoglucolipid II in reiner Form abgetrennt. Die verbliebene Überschneidungsfraction wäre besser unmittelbar der präparativen Dünnschichtchromatographie unterworfen worden, da die versuchte Trennung über Säule Nr. V (Schema 6) wenig Erfolg brachte.

Die nach Schema 5 und 6 gereinigten Lipide wurden abschließend über kleine Säulen von Kieselgel chromatographiert, um Pigmente und andere kohlenhydrat- und phosphatfreie Verunreinigungen zu entfernen.

Die oben genannten Ergebnisse zeigen, daß selbst anionische Phospholipide von geringer Polarität über DEAE-Cellulose mit entsprechend wenig polaren Elutionsmitteln getrennt werden können. Die Trennung ist jedoch zeitraubend und wird bei geringeren Lipidmengen zweckmäßiger durch präparative Dünnschichtchromatographie ersetzt.

II.2.6 Trennung von Phosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid III

Bei der Fraktionierung des Rohextraktes über die in II.2.1 beschriebenen DEAE-Säulen wurden bei Elution mit 0,05 % Ammoniumacetat in Chloroform-Methanol (2:1) zwei Fraktionen erhalten, die neben Phosphoglucolipid III unterschiedliche Anteile an Phosphatidylglycerin und Lysoderivate der Phosphoglucolipide enthielten (Abbildung 9, Fraktion 7 u. 8).

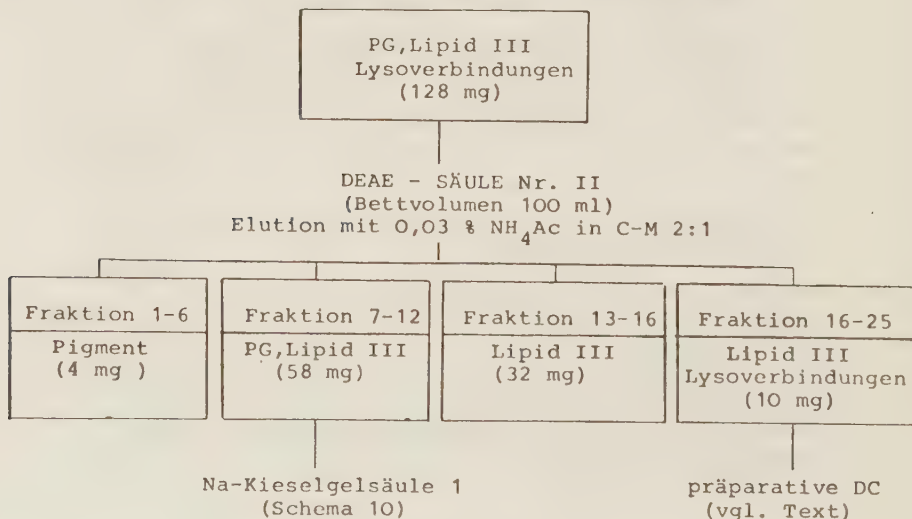
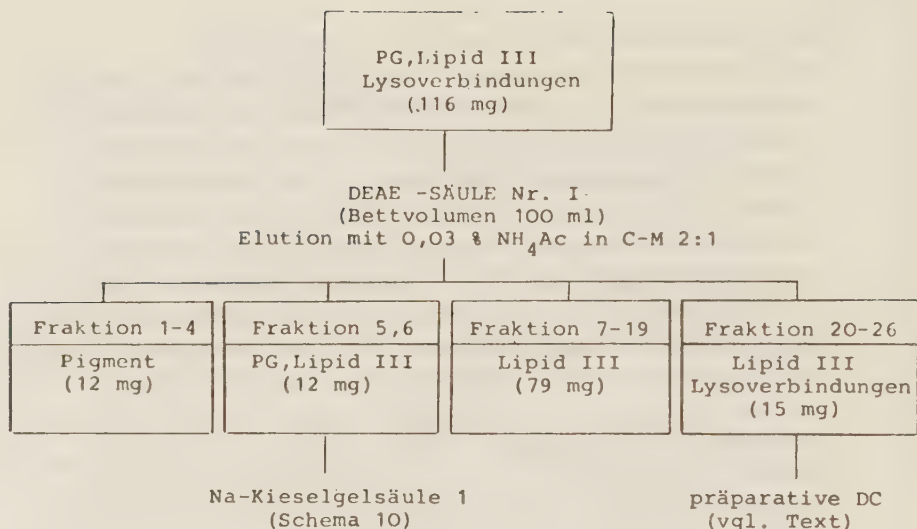
Zunächst wurde eine Trennung über zwei DEAE-Cellulose-Säulen versucht (Schema 7), wobei gegenüber der Erst-Fraktionierung bei unveränderter Polarität des Elutionsmittels die Salzkonzentration auf 0,03 % herabgesetzt wurde. Es konnte auf diese Weise 111 mg Phosphoglucolipid III (45 % des Ausgangsgewichts) abgetrennt werden. Die Trennung von Phosphoglucolipid III und den Lyso-Verbindungen war unvollständig (Säule I, Fraktion 2d - 26; Säule II, Fraktion 16 - 25); Phosphoglucolipid III wurde aus diesen Überschneidungsfractionen durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert¹⁾ (22 mg). Von jeder der beiden Säulen wurde außerdem eine Mischfraktion erhalten (Säule I, Fraktion 5 u.6; Säule II, Fraktion 7 - 12), die Phosphoglucolipid III und das gesamte Phosphatidylglycerin enthielt. Eine Trennung auf DEAE-Cellulose gelang auch bei Herabsetzung der Polarität des Elutionsmittels nicht (Chloroform-Methanol, 6:1, v/v, mit 0,05 % Ammoniumacetat).

Die Trennung erfolgte daher, wie bereits früher beschrieben (51, 52), säulenchromatographisch über Kieselgel, das in die Natriumsalzform übergeführt worden war (Schema 8). Auf der ersten Säule war die Trennung nicht vollständig; die Überschneidungsfraction (5, Schema 8) wurde jedoch mit Erfolg über eine zweite Säule rechromatographiert.

Der unterschiedliche Trenneffekt der beiden Säulen könnte darauf beruhen, daß die Lipide auf die erste Säule als Gemisch von Natrium- und Ammoniumsalzen aufgebracht wurden,²⁾ während sie nach Passage dieser Säule einheitlich als Natriumsalze vorgelegen haben dürften (vgl. 42, 44).

¹⁾ Kieselgel-Fertigplatten (Merck), Solvens: Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser 50:20:10:10:5 (p.Vol.). Anfärbung und Extraktion, vgl. methodischer Teil S. 148

²⁾ Nach der DEAE-Säule war das Ammoniumacetat durch Folch-Verteilung entfernt worden, wobei als Wasserphase 0,45 % NaCl-Lösung verwendet wurde.



Schema 7: Vorfraktionierung von Phosphatidylglycerin und Phosphoglu-
lipid III durch Säulenchromatographie über DEAE-Cellulose, Acetat.
 116 und 128 mg Lipid aus den vier DEAE-Säulen der Erstfraktionierung
 (Abb. 9, Fraktion 7 und 8). Säulenchromatographie: DEAE-Cellulose-Säu-
 le Nr. I und II (Füllmenge 25g; Säulendurchmesser: 2,4 cm; Füllhöhe:
 30 cm). Gesammelt wurden Fraktionen von 100 ml. Abkürzungen: PG,
 Phosphatidylglycerin; Lipid III, Phosphogluclipid III; Lysoverbindun-
 gen vorwiegend Monodesacylderivat von Phosphogluclipid III; übrige Ab-
 kürzungen wie in Schema 5.

Fraktion 5, 6 aus DEAE-Säule I (Schema 7) Fraktion 7-12 aus DEAE-Säule II (Schema 9)					"Natrium-Kieselgel" <u>Säule Nr. 1</u>	
Phosphatidylglycerin Phosphoglucolipid III (70 mg)						
1	Chloroform	200 ml	→			
2	Chloroform-Methanol 9:1	200 ml	→			
3	Chloroform-Methanol 7:1	400 ml	→			
4	Chloroform-Methanol 6:1	200 ml	→	Phosphatidylglycerin	(7 mg)	
5	Chloroform-Methanol 6:1	400 ml	→	Phosphatidylglycerin Lipid III	(23 mg)	
6	Chloroform-Methanol 6:1	200 ml	→	Lipid III	(26 mg)	
7	Chloroform-Methanol 2:1	200 ml				

Fraktion 5 aus "Natrium-Kieselgel"-Säule 1					"Natrium-Kieselgel" <u>Säule Nr. 2</u>	
Phosphatidylglycerin Phosphoglucolipid III (23 mg)						
1	Chloroform	100 ml				
2	Chloroform-Methanol 9:1	100 ml				
3	Chloroform-Methanol 6:1	150 ml	→	Phosphatidylglycerin	(8 mg)	
4	Chloroform-Methanol 6:1	150 ml	→	Lipid III	(15 mg)	
5	Chloroform-Methanol 1:1	100 ml				

Schema 8: Trennung von Phosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid III über Säulen von "Natrium-Kieselgel". Säulenfüllung: 2 Gewichtsteile Kieselgel (Malinckrodt, 100 mesh) und 1 Gewichtsteil Hyflo Super Cel, mit HCl, NaHCO₃ und CO₂-freiem Wasser nach (52) gewaschen, getrocknet und aktiviert. Säule 1 : 20 g (Durchmesser 2,4 cm; Füllhöhe 15 cm), gesammelt wurden Fraktionen von 100 ml. Säule 2: 10 g (Durchmesser 2,4 cm; Füllhöhe 8 cm); gesammelt wurden Fraktionen von 25 ml.

II.2.7 Isolierung von Cardiolipin und Phosphoglucolipid V.

Bei der Fraktionierung des Lipidrohextraktes (II.2.1) waren drei Chargen (A, B, C) erhalten worden, die Cardiolipin und wechselnde Anteile an Phosphoglucolipid V enthielten:

- A (168 mg) Hauptbestandteil Cardiolipin; daneben Phosphoglucolipid IV sowie Lysoderivate von Cardiolipin und Phosphoglucolipiden; kein Phosphoglucolipid V.
- B (661 mg) Hauptbestandteil Cardiolipin; daneben Lyso-derivate wie in Charge A, Pigment, relativ wenig Phosphoglucolipid V (Abbildung 9).
- C (205 mg) Cardiolipin, Lysocardiolipin, Hauptanteil von Phosphoglucolipid V.

Zunächst erfolgte eine Grobfraktionierung der Chargen B und C über je eine Kieselgelsäule, um eine weitere Vortrennung von Cardiolipin und Phosphoglucolipid V zu erzielen. Überschneidungsfractionen wurden über eine dritte Säule rechromatographiert. Die Eluate ließen sich in drei Fraktionen zusammenfassen, die folgende Zusammensetzung aufweisen:

Fraktion 1 (656 mg): Hauptbestandteil Cardiolipin; daneben Lysoverbindungen und Pigment.

Fraktion 2 (79 mg): Lysocardiolipin

Fraktion 3 (125 mg): Phosphoglucolipid V und Lysocardiolipin.

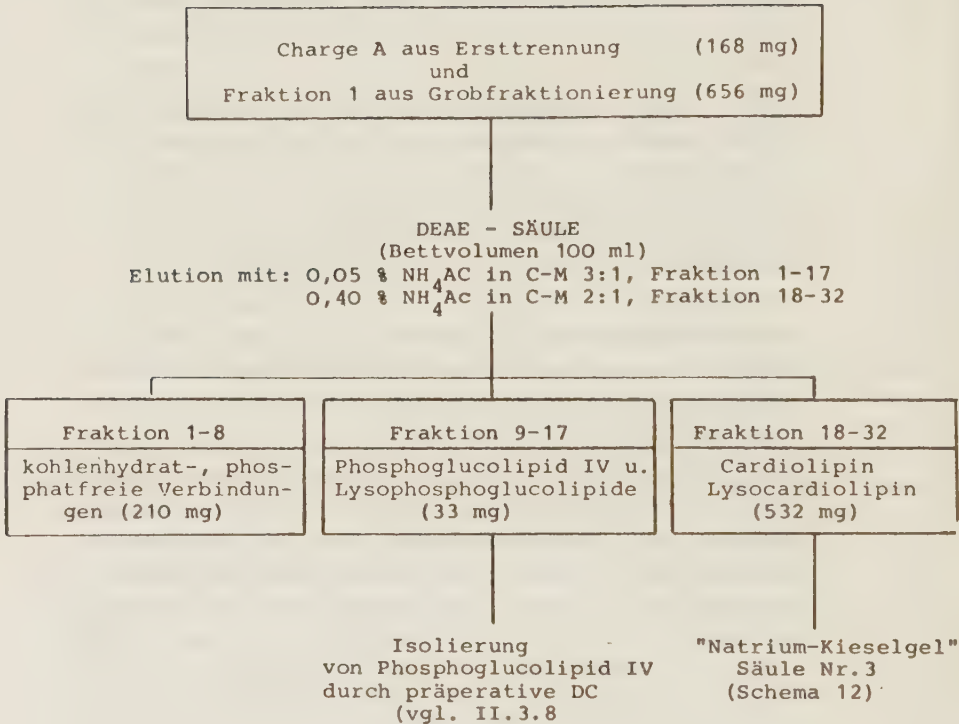
Zur Isolierung von Cardiolipin wurde Charge A aus der Fraktionierung des Rohextraktes und Fraktion 1 aus der vorgenannten Grobfraktionierung vereinigt. Der nächste Trennschritt erfolgte durch Säulenchromatographie über

DEAE-Cellulose, um Cardiolipin aufgrund seiner doppelt negativen Ladung von dem einfach negativ geladenen Phosphoglucolipid IV, den Lysophosphoglucolipiden und nicht näher charakterisierten Pigmenten abzutrennen. Das Ergebnis ist in Schema 9 zusammengefaßt. Durch relativ niedrige Salzkonzentration und Polarität konnten Phosphoglucolipid IV und die Verunreinigungen abgetrennt werden, so daß Cardiolipin nur noch mit seinen Lysoverbindungen, vorwiegend dem Monodesacylderivat, vergesellschaftet war. Für die Trennung kam nach den Erfahrungen der Grobfractionierung Säulenchromatographie über Kieselgel nicht in Frage, da sich hierbei Cardiolipin und Monodesacylcardiolipin breit überschneiden. Die Trennung erfolgte deshalb durch Säulenchromatographie über "Natrium-Kieselgel", wobei zwei Säulen mit je der Hälfte des Gesamtlipids (532 mg) beschickt wurden. Wie Schema 10 zeigt, wurden beim ersten Trenngang 416 mg reines Cardiolipin erhalten. Die Überschneidungsfraction (73 mg) wurde über eine dritte kleinere Säule (10 mg "Natrium-Kieselgel") rechromatographiert. Dabei trennte Cardiolipin (31 mg) praktisch vollständig von der Lyso-Verbindung ab.

Phosphoglucolipid V lag nach der Grobfractionierung ausschließlich in Fraction 3 vor. Die Abtrennung von Mono- und Didesacylcardiolipin gelang durch eine Säulentrennung über "Natrium-Kieselgel" (Schema 11).

II.2.8 Isolierung von Phosphoglucolipid IV.

Anhaltspunkte für das Vorhandensein eines Phosphatidyl- α -kojitriosyl-diglycerides hatten sich bei der Aufarbeitung des Lipidextraktes aus *S.haemolyticus* (2. Zucht) ergeben. Nach Desacylierung der die Lysoderivate der Phosphoglucolipide enthaltenden Fractionen war bei Verteilungschromatographie eine Verbindung gefunden



Schema: 9: Erster Trenngang zur Isolierung von Cardiolipin durch Säulenchromatographie über DEAE-Cellulose, Acetat.
 800 mg Lipid mit Cardiolipin als Hauptbestandteil aus den vier DEAE-Säulen der Erstfraktionierung (Abbildung 9, Fraktion 9).
 Säule: Füllmenge: 25 g, Durchmesser: 2,4 cm; Füllhöhe: 30 cm.
 Gesammelt wurden Fraktionen von 100 ml.

Fraktion 18-32 aus DEAE-Säule (Schema 9)			"Natrium-Kieselgel" Säule Nr.3 u. 4	
Cardiolipin, Lysocardiolipin (532 mg)				
1	Chloroform	100 ml		
2	Chloroform-Methanol 9:1	200 ml	→	Cardiolipin (416 mg)
3	Chloroform-Methanol 9:1	200 ml	}	Cardiolipin Lysocardiolipin (73 mg)
4	Chloroform-Methanol 1:1	400 ml		

Schema 10: Isolierung von Cardiolipin durch Säulenchromatographie über "Natrium-Kieselgel". 532 mg Lipid wurden über zwei Säulen mit "Natrium-Kieselgel" getrennt. Pro Säule 20 g "Natrium-Kieselgel" (vgl. Schema 8). Säulendurchmesser 2,4 cm, Füllhöhe 14 cm. Gesammelt wurden Fraktionen von 25 ml.

Fraktion 3 (vgl. Text)			"Natrium-Kieselgel"	
Phosphoglucolipid V Lysocardiolipin (125 mg)				
1	Chloroform	100 ml	}	
2	Chloroform-Methanol 4:1	200 ml		
3	Chloroform-Methanol 3:1	100 ml	Lysocardiolipin (42 mg)	
4	Chloroform-Methanol 3:1	300 ml	→	Phosphoglucolipid V (62 mg)
5	Chloroform-Methanol 1:1	200 ml	→	nicht charakterisiert (5 mg)

Schema 11: Isolierung von Phosphoglucolipid V durch Säulenchromatographie über "Natrium-Kieselgel". 125 mg Lipid, Fraktion 3 der Grobfraktionierung (vgl. Text). Säule: 20 g "Natrium-Kieselgel" (vgl. Schema 8), Säulendurchmesser 2,4 cm, Füllhöhe 14 cm. Gesammelt wurden Fraktionen von 25 ml.

worden, die langsamer als Glycerophosphoryl- α -kojibiosylglycerin wanderte und durch Alkalihydrolyse in Glycerinphosphat und α -Kojitriosylglycerin gespalten wurde (17 - 22).

Die Suche nach dieser Verbindung war schwierig, da keine Vergleichssubstanz vorlag und bei der Isolierung von Cardiolipin, Phosphoglucolipid III und V eine große Zahl von Fraktionen erhalten wurden, die zahlreiche kohlenhydrat- und phosphathaltige Verbindungen, meist Mono- und Didesacylderivate von Phosphoglucolipid II und III enthielten. Einige dieser Verbindungen wurden durch eindimensionale Bandenchromatographie auf Kieselgeldünnschichtplatten gereinigt. Ein kleiner Teil (ca. 60 nmol) wurde jeweils einer alkalischen Phosphodiestererspaltung (0,1 M NaOH, 24 h, 100°C) unterworfen. Die Spaltprodukte wurden verteilungschromatographisch auf das Vorhandensein von α -Kojitriosylglycerin geprüft,¹⁾ wobei die Desacylierungsprodukte von α -Kojibiosyl- und α -Kojitriosyldiglycerid als Vergleichssubstanzen dienten. Während in den meisten Fällen Diglucosylglycerin auftrat, fand sich schließlich ein Lipid, das bei der Spaltung nur Triglucosylglycerin ergab. Dieses Lipid diente für die weitere Suche als Vergleichssubstanz. Chromatographisch entsprechende Fraktionen wurden mittels Probehydrolyse in Alkali geprüft und vereinigt. Aus den vereinigten Fraktionen wurde Phosphoglucolipid IV durch präparative Dünnschichtchromatographie²⁾ von

1) Kieselgel Fertigplatten (Merck); Solvens: Propan-(1)-ol-Pyridin-Wasser (7:4:3, per Vol.). Färbung: α -Naphthol-Schwefelsäure.²⁾ Kieselgel Fertigplatten (Merck); mindestens je ein Lauf mit Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser (50:20:10:10:5, per Vol.) und Chloroform-Methanol-Ammoniak (d = 0,91)-Wasser (65:30:3:3, per Vol.). Nach jedem Lauf wurde die Lipid IV-haltige Zone ausgekratzt und eluiert.

insgesamt 15 Verunreinigungen abgetrennt. Es wurden 7,2 mg in chromatographisch einheitlicher Form erhalten, was sicher nur ein Bruchteil der ursprünglich vorhandenen Menge ist (vgl. Abbildung 5, Seite 16).

Auch kann nicht entschieden werden, ob Stellungs- isomere bezüglich des Phosphatidylrestes, die entsprechend Phosphoglucolipid II und III chromatographisch unterscheidbar sein sollten, vorhanden sind. Hierzu hätten weitere Komponenten mit geringeren R_F - Werten geprüft werden müssen.

II.2.9 Bilanz der Trennung

Die aus *S.haemolyticus* isolierten Lipide sind mit ihren Gewichten in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Summe der isolierten Gluco-, Phospho- und Phosphoglucolipide ergab 2,21 g, d.i. 45,7 % vom Gewicht des Lipidhextraktes (4,79 g).

Um eine abschließende Bilanz erstellen zu können, wurden alle Fraktionen, die bei der Trennung nicht weiter aufgearbeitet wurden, gesammelt und entsprechend ihrer Herkunft zu drei Fraktionen (A, B, C) vereinigt.

Fraktion A (1,4 g) umfaßt wenig polare Verbindungen, die bei der Fraktionierung des Rohextraktes über DEAE-Cellulose mit Chloroform eluiert wurden (Abbildung 9, Fraktion 1); etwas über 100 mg dieser Fraktion bestehen aus polareren Komponenten, die bei der Reinigung der Glykolipide abgetrennt wurden (II.2.3, II.2.4). Es handelt sich dabei zum Teil um intensiv gelb und gelbbraun gefärbte Verbindungen, die auch bei Dünnschichtchromatographie wenig polaren Charakter zeigen und dem färberischen Verhalten nach weder Kohlenhydrate noch Phosphat enthalten.

Fraktion B (480 mg) besteht ebenfalls aus kohlenhydrat-

Tabelle 4: Zusammenstellung der Gewichte der isolierten Lipide und ihrer prozentualen Anteile a) am Lipidrohextrakt (4,79 g) und b) an den polaren Lipiden (Gluco-, Phospho- und Phosphoglucolipide), Zusammensetzung und Herkunft von Fraktion A-C vgl. Text.

Verbindung	Menge	Prozentanteil	
	(mg)	(a)	(b)
Monoglucosyldiglycerid	16	0,3	0,7
N-Acetylglucosaminyldiglycerid	31	0,6	1,4
α -Kojibiosyldiglycerid	980	20,4	44,4
α -Kojitriosyldiglycerid	175	3,7	7,9
Phosphatidylglycerin	11	0,2	0,5
Acylphosphatidylglycerin	23	0,5	1,0
Cardiolipin	446	9,2	20,4
Lysocardiolipin	121	2,5	5,5
Phosphoglucolipid			
I	31	0,6	1,4
II	181	3,7	8,3
III	127	2,7	5,7
IV	7	-	-
V	62	1,3	2,8
Summe	2 211	45,7	100,0
Sonstige lipidlösliche Verbindungen			
Fraktion A	1 398	29,0	-
Fraktion B	480	10,0	-
Fraktion C	67	1,4	-
Gesamtsumme	4 156	86,3	

und phosphatfreien Verbindungen von zum Teil intensiver Eigenfarbe. Sie verhalten sich bei Dünnschichtchromatographie weitgehend apolar, wurden aber bei Fraktionierung des Rohextraktes erst mit Ammoniumacetat eluiert. Ihre Abtrennung von den anionischen Lipiden erfolgte zum Teil erst bei Fraktionierung über Kieselgelsäulen.

Fraktion C (67 mg) enthält Überschneidungsfractionen, die bei der Isolierung der anionischen Lipide anfielen. Dünnschichtchromatographisch ist neben Pigment Cardiolipin, Mono- und Didesacylcardiolipin und in geringer Menge Phosphoglucolipid V nachweisbar. Auf eine weitere Trennung wurde wegen zahlreicher Verunreinigungen verzichtet.

Wie Tabelle 4 zeigt, wurden mit den isolierten Verbindungen und den vorgenannten Fraktionen A bis C 4,15 g oder 86,3 % der Menge des eingesetzten Rohlipids wiedergefunden. Für den Verlust von etwa 14 % sind vorwiegend Trennschritte über Kieselgelsäulen verantwortlich, wobei 5 - 10 % der eingesetzten Mengen nicht oder nur sehr schwer eluierbar sind. In einem Fall wurde die Restmenge mit Chloroform-Methanol-Wasser (65:35:8, per Vol.) eluiert. Sie zeigte im Gegensatz zu den vorab eluierten Fraktionen keine Selektionierung bestimmter Molekülspezies (vgl. II.1., Tabelle 3, Seite 26), wodurch eine Verfälschung des ursprünglichen Fettsäuremusters ausgeschlossen ist.

II.3 Isolierung der Lipide aus Streptococcus faecalis var. faecalis und var. zymogenes.

Die Lipidrohextrakte dieser Streptococcen-Stämme waren wie in II.1.1 beschrieben, primär über Kieselgelsäulen fraktioniert worden. Damit waren eine grobe Trennung in nicht-ionische, anionische polare und anioni-

sche stark polare Lipide erzielt worden. Im folgenden wird ein kurzer Überblick über die weitere Trennung gegeben.

II.3.1 Isolierung von α -Kojibiosyldiglycerid.

Die Isolierung erfolgte ähnlich wie in II.2.4 beschrieben durch Säulentrennung über Kieselgel, wodurch sowohl kohlenhydratfreie wenig polare Komponenten, wie auch beim ersten Trenngang durchgebrochene Phospholipide entfernt wurden.

II.3.2 Isolierung von Cardiolipin, Phosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid III.

Diese drei anionischen Lipide waren beim ersten Trennschritt in zwei Fraktionen erhalten worden, von denen die vorab eluierte mehr Phosphoglucolipid III, die spätere mehr Phosphatidylglycerin enthielt.

Zunächst wurden Restmengen an nicht-ionischen Komponenten, vorwiegend Diglucosyldiglycerid durch einen Trennschritt über DEAE-Cellulose entfernt, wobei die anionischen Lipide unfraktioniert mit 0,4 % Ammoniumacetat in Chloroform-Methanol (2:1, v/v) eluiert wurden.

Die Isolierung der Phospholipide erfolgte dann durch Säulenchromatographie über "Natrium-Kieselgel" (II.2.6, Schema 8 und 10), wobei eine mehrmalige Rechromatographie der Überschneidungsfractionen erforderlich war. Cardiolipin wurde vorab mit Chloroform-Methanol (9:1, v/v) eluiert, während bei Elution mit dem Mischungsverhältnis 6:1 Phosphatidylglycerin in den früheren und Phosphoglucolipid III in den späteren Fraktionen erschien. Verunreinigungen von Phosphoglucolipid III mit Lysoverbindungen, wie sie in den letzten Fraktionen auftraten, konnten gleichfalls

durch Rechromatographie oder durch präparative Dünnschichtchromatographie entfernt werden.

II.3.3 Isolierung von Phosphoglucolipid V und VI.

Bei der Erstfraktionierung waren Phosphoglucolipid V und VI zusammen mit Lysocardiolipin mit polaren Chloroform-Methanol-Gemischen (3:1 bis 2:1, v/v) eluiert worden.

Lysocardiolipin ließ sich durch wiederholte Rechromatographie über einfache Kieselgelsäulen unter Anwendung eines gestuften Polaritätsgradienten abtrennen.

Alle Versuche, auf dieselbe Weise Phosphoglucolipid V und VI zu trennen, blieben erfolglos, da, wie das Beispiel in Schema 12 zeigt, Phosphoglucolipid VI stets zweigipflig eluiert wurde. Ursache hierfür sind offensichtlich die beiden Phosphodiestergruppen im Molekül, da ein ähnliches Verhalten auf Kieselgel auch für Cardiolipin beschrieben ist (vgl. 45).

Eine vollständige Trennung gelang schließlich durch Säulenchromatographie auf "Natrium-Kieselgel" (Schema 13), wobei Phosphoglucolipid VI eingipflig vor Phosphoglucolipid V eluiert wurde.

Damit zeigen Phosphoglucolipid VI und V bei Chromatographie auf Kieselgel ein analoges Verhalten wie Cardiolipin und Phosphatidylglycerin. Von beiden Paaren wird die Verbindung mit zwei Phosphodiestergruppen vor der mit einer Phosphodiestergruppe eluiert, während auf DEAE-Cellulose die Elutionsfolge umgekehrt ist.¹⁾ Das zeigt, daß die anionischen Gruppen eine of-

¹⁾ Inzwischen wurde gezeigt, daß Phosphoglucolipid VI aus DEAE-Cellulose nach Lipid V eluiert wird (W. Fischer, unveröffentlicht).

60 mg Lipid

1	Chloroform-Methanol 2:1 75 ml		
2	Chloroform-Methanol 1,8:1 45 ml	Phosphoglucolipid VI	9 mg
3	Chloroform-Methanol 1,8:1 30 ml	Phosphoglucolipid VI und V	22 mg
4	Chloroform-Methanol 1,25:1 75 ml	Phosphoglucolipid V	3 mg
5	Chloroform-Methanol 1:1 60 ml	Phosphoglucolipid V	7 mg
6	Chloroform-Methanol 1:1 60 ml	Phosphoglucolipid V und VI	7 mg
7	Chloroform-Methanol 1:2 100 ml		

Schema 12: Versuch einer Trennung von Phosphoglucolipid V und VI durch Säulenchromatographie über Kieselgel. Säule: Füllmenge: 40 g, Durchmesser: 2,4 cm, Füllhöhe: 25 cm. Gesammelt wurden Fraktionen von 15 ml.

35 mg Lipid

1	Chloroform-Methanol 5:1 120 ml		
2	Chloroform-Methanol 3:1 120 ml	nicht identi- fizierte Phospholipide 10 mg	
3	Chloroform-Methanol 2:1 90 ml		
4	Chloroform-Methanol 2:1 30 ml	Phosphoglucolipid VI	8 mg
5	Chloroform-Methanol 1,8:1 90 ml		
6	Chloroform-Methanol 1,8:1 30 ml	Phosphoglucolipid V	13 mg
7	Chloroform-Methanol 1:1 60 ml		
8	Chloroform-Methanol 1:2 60 ml		

Schema 13: Trennung von Phosphoglucolipid V und VI durch Säulenchromatographie über "Natrium-Kieselgel". Säule: Füllmenge 10 g, Durchmesser: 2,2 cm, Füllhöhe: 7 cm. Gesammelt wurde ab 3 in Fraktionen von 15 ml.

fenbar untergeordnete Rolle bei der Adsorption an Kieselgel spielen (vgl. II.1.1). Für die stärkere Adsorption von Phosphatidylglycerin kann nur die zusätzliche Hydroxylgruppe verantwortlich sein, wobei hinzukommt, daß die beiden Hydroxylgruppen des Phosphatidylglycerins offener liegen, da der Abschirmeffekt durch zwei Fettsäureketten geringer ist als durch vier. Bestätigt wird diese Vorstellung durch / das Trennverhalten von Phosphoglucolipid VI und V (vgl. Strukturformeln, Seite 1u.2).

III. ANALYSE DER FETTSÄUREN

III.1 Identifizierung

Die Fettsäuren wurden durch milde Alkalihydrolyse aus den Lipiden oder ihren im nächsten Abschnitt beschriebenen Abbauprodukten freigesetzt und nach Methylierung mit Diazomethan (54, 55) gaschromatographisch identifiziert. Hierzu wurde eine apolare Säule (SE 30) und eine polare Säule (DEGS) verwendet, deren Trenncharakteristika in Abbildung 10 und 11 wiedergegeben sind. Die Läufe wurden bei programmierter Säulentemperatur durchgeführt, wobei die Retentionszeiten für die Glieder einer homologen Reihe linear proportional der Kohlenstoffatomzahl sind (56). Die polare Säule ist der apolaren überlegen, da sie gesättigte, ungesättigte, verzweigt-kettige und Cyclopropansäuren trennt.

Die Identifizierung wurde wie folgt durchgeführt:

- (i) Chromatographie des unbekannten Gemisches über beide Säulen und Vergleich der Retentionszeiten mit den für authentische Fettsäuremethylester ermittelten. In Zweifelsfällen wurde das Gemisch mit dem entsprechenden authentischen Ester cochromatographiert.

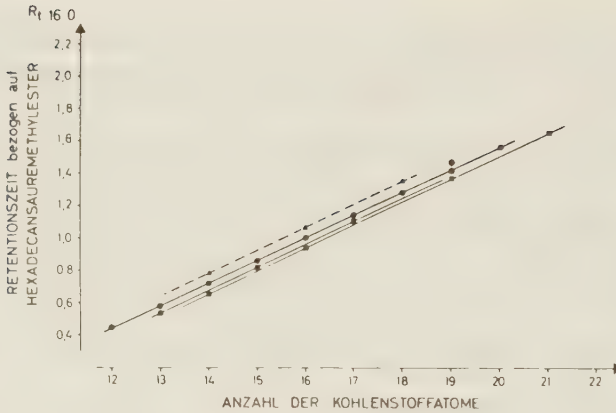


Abb. 10: Trenncharakteristik einer DEGS - Säule für Fettsäuremethylester bei Gaschromatographie mit programmierter Säulentemperatur. Ordinate: Relative Retentionszeit bezogen auf den Methyl-ester von Hexadecansäure; Abzisse: Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäuren. ● - ● Methyl-ester von unverzweigten, gesättigten Fettsäuren, ■ - ■ von gesättigten (n-1)- und (n-2)- Methylalkansäuren und ▲ - ▲ von unverzweigten Monoensäuren. * Methyl-ester der Lactobacillinsäure (C - Cyclopropansäure). Gaschromatographie: Säule (Glas): 10 % DEGS auf Chromosorb W AW DMCS 80/100, 210 cm x 3 mm; Säulentemperatur: 98-210 °C; Flammenionisationsdetektor: 230 °C.

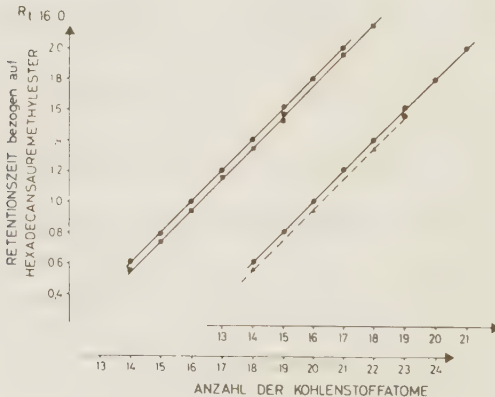


Abb. 11: Trenncharakteristik einer SE 30 - Säule für Fettsäuremethylester bei Gaschromatographie mit programmierter Säulentemperatur. Symbole wie in Abb. 10. Methyl-ester der (n-1)- und (n-2)-Methylalkansäuren blieben ungetrennt. Gaschromatographie: 2 % SE 30 auf Chromosorb W AW DMCS 80/100; Säulentemperatur: 95-210 °C, 2 °C/min. Weitere Angaben sind in Legende zu Abb. 10 enthalten.

- (ii) Chromatographie nach Hydrierung des Gemisches (57): Ungesättigte Fettsäuren sind nicht mehr nachweisbar, die Peakflächen der zugehörigen gesättigten Säuren entsprechend erhöht (Tabelle 5). C_{19} -Cyclopropansäure bleibt intakt.

Tab. 5 Nachweis von ungesättigten Fettsäuren und C_{19} -Cyclopropansäure durch Hydrierung und Bromierung der Fettsäuremethylester im Lipidextrakt aus *Streptococcus faecalis*. Die Trennung erfolgte auf der apolaren Säule (SE 30). Werte in Gewichtsprozent.

FETTSÄURE- METHYLESTER von R_t 16:0	ohne Vorbe- handlung	hydriert	bromiert
14:0	0,56	3,2	2,6
14:1	0,53	0,6	-
16:1	0,93	9,0	-
16:0	1,00	22,2	27,7
18:1	1,46	34,2	-
18:0	1,52	4,4	4,1
19cy	1,75	26,3	29,3
x_1	2,35	-	5,7
x_2	2,92	-	30,5

- (iii) Chromatographie nach Bromierung unter milden Bedingungen (57, 58): Ungesättigte Fettsäuren sind nicht mehr nachweisbar; es werden auf der apolaren Säule zwei Verbindungen mit verzögerter Retentionszeit gefunden, die den bromierten Derivaten entsprechen könnten (x_1 und x_2 ; Tabelle 5). C_{19} -Cyclopropansäure bleibt intakt.

- (iv) Chromatographie nach Behandlung mit BF_3 (59):
Anstelle von C_{19} -Cyclopropansäure wird eine Reihe von Derivaten gefunden, die in Anzahl, Intensität und Retentionszeit mit den aus authentischer C_{19} -Cyclopropansäure erhaltenen Derivaten übereinstimmen (vgl. 59).
- (v) Chromatographie nach Trimethylsilylierung: Die Retentionszeiten aller Verbindungen bleiben unverändert, was das Vorhandensein von Hydroxyfettsäuren ausschließt.

III.2. Quantifizierung

Die Peakflächen wurden über Höhe $\times$ Halbwertsbreite berechnet, wobei die Halbwertsbreite mit einer Meßlupe (7x; Bausch & Lomb) ermittelt wurde. Die Analysen wurden im linearen Ansprechbereich des Detektors durchgeführt. Ansprechfaktoren wurden nicht verwendet, da die für länger-kettige Fettsäuren ermittelten Unterschiede vernachlässigbar sind (56).

Die Anteile der einzelnen Fettsäuren wurden wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Anteil} = \frac{\sum \text{Peakfläche}}{\sum \text{Peakflächen}} \times 100$$

Bei Angaben in Mol% wurde das jeweilige Molekulargewicht berücksichtigt:

$$\text{Mol\%} = \frac{\sum \text{Peakfläche} \times \text{Molgew.}^{-1}}{\sum \text{Peakflächen} \times \text{Molgew.}^{-1}} \times 100$$

IV. ANALYSE DER FETTSÄUREVERTEILUNG AUF DIE BEIDEN POSITIONEN DER GLYCERINANTEILE IN GLUCO-, PHOSPHO- UND PHOSPHOGLUCOLIPIDEN

IV.1 Analyse der Fettsäureverteilung in Glucolipiden mit Lipase aus *Rhizopus arrhizus delemar*

Positionsspezifische Glykolipid-Acylhydrolasen sind derzeit nicht bekannt. Die in Bohnenblättern gefundenen Galaktosyldiglycerid-Acylhydrolasen sind zwar spezifisch für Galaktosyldiglyceride, spalteten jedoch die Fettsäuren aus beiden Positionen des Glycerinanteiles ab (60). Es mußte daher auf positionsspezifische Lipasen (Glycerolester-Hydrolase, EC 3.1.1.3) zurückgegriffen werden.

α -Kojibiosyldiglycerid ließ sich nur mit Lipase aus dem Pilz *Rhizopus arrhizus delemar*, nicht aber mit Pankreaslipase spalten, was auf Unterschiede in der spezifischen Aktivität¹⁾ handelsüblicher Präparate zurückgeführt werden konnte (18, 61). Die *Rhizopus*-lipase spaltet wie Pankreaslipase nur Fettsäureester an der primären Hydroxylgruppe des Glycerins, unabhängig davon, ob es sich um Triglyceride (18, 62), Phospholipide (18, 63) oder Glykolipide (18, 61, 63) handelt. Außerdem werden gesättigte Fettsäuren, Monoen-, Polyen-, Cyclopropansäuren sowie verzweigt-kettige Fettsäuren freigesetzt (61, 64, 65).

Wie Tabelle 6 zeigt, setzt *Rhizopus*lipase alle in Streptococcen vorkommenden Glykolipide sowie Phosphoglucolipid V um. Die Angreifbarkeit geht mit zunehmender Größe des hydrophilen Anteils beträchtlich zurück. Trotzdem kann bei entsprechender Reaktionszeit und er-

¹⁾ *Rhizopus* Lipase (670 U/mg); teilweise gereinigte Pankreaslipase (27 U/mg).

höherer Enzymkonzentration eine für die Fettsäureverteilungsanalyse ausreichende Spaltung erzielt werden. Phosphoglucolipid V läßt sich leichter analysieren, wenn man vorher den Glycerinphosphatanteil mit Essigsäure abspaltet (vgl. S. 75).

Tab. 6 Spaltbarkeit der Glucolipide aus Streptococcus haemolyticus mit Rhizopuslipase. Die in Chloroform-Methanol (2:1, v/v) gelösten Lipide wurden mit Triton-X-100 (2-4 mg/Mol Lipid) am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Nach Zugabe von 0,04 M Tris-HCl-Puffer wurde, falls erforderlich, das Reaktionsgemisch mit Ultraschall behandelt, um eine klare Lösung zu erhalten. Das Ausmaß der Spaltung wurde nach Dünnschichtchromatographie aus der Fleckenintensität von intakt gebliebenem Lipid und entstandener Lysoverbindung geschätzt.

SUBSTRAT	Substrat Mol/ml	Enzym mg/ml	Inkubations- dauer (Stdn.)	Spaltung %	
Monoglucosyl- diglycerid	1,0	5,0	3150	0,25	100
	1,0	1,0	630	0,75	100
N-Acetylglucos- aminyldiglycerid	1,0	5,0	3150	0,25	90
α -Kojibiosyl- diglycerid	3,0	5,0	3150	3-4	100
	1,0	5,0	3150	1	50
α -Kojitriosyl- diglycerid	3,0	40,0	25200	16	50
Phosphogluco- lipid v	1,0	5,0	3150	24	20

Die Ergebnisse der Fettsäureverteilungsanalyse am α -Kojibiosyldiglycerid von *S. haemolyticus* und *S. lactis* sind in Tabelle 7 und 8 als Beispiele gegeben. Sie zeigen:

- (i) Das nach partieller Spaltung intakt gebliebene Lipid hat dieselbe Fettsäurezusammensetzung wie die Ausgangsverbindung (Tabelle 7, Spalte 1 und 2), was eine bevorzugte Abspaltung bestimmter Fettsäuren ausschließt.

Tab. 7: Fettsäureverteilungsanalyse am Diglucosyldiglyceridanteil aus Phosphogluco-
lipid V, Streptococcus haemolyticus, mit Rhizopuslipase.

Diglucosyldiglycerid wurde aus Phosphoglucolipid V durch Phosphodiester-spaltung mit 98 % (v/v) Essigsäure erhalten (vgl. Seite 75). Als Vergleich sind die Ergebnisse nach ein- und vierstündiger Inkubationsdauer aufgeführt. Die Fettsäuren in Position 1 wurden als Differenz zwischen dem doppelten Wert der Fettsäuren im Ausgangslipid minus den in den Lysoverbindungen gefundenen Werten berechnet. Alle Angaben in Mol%.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	GESAMTLIPID		Lyso verbindung		freigesetzte Fettsäuren		berechnet	
	a	b	1 Std.	4 Stdn.	1 Std.	4 Stdn.	1 Std.	4 Stdn.
FETTSÄUREN								
14:0	1,4	1,9	1,0	1,2	1,9	1,7	1,8	1,6
16:0	39,5	38,6	34,2	37,3	40,6	39,7	44,8	41,7
16:1	14,9	14,2	9,4	10,4	16,9	17,3	20,3	19,3
18:0	3,4	4,9	1,8	1,7	6,3	6,8	5,1	5,2
18:1	40,8	40,5	53,6	49,8	34,4	34,5	28,0	31,9

a) Fettsäuren des Ausgangslipides, b) Fettsäuren des nach einstündiger Inkubation in-
takt gefundenen Lipids.

- (ii) Die Analysenergebnisse sind reproduzierbar (Tabelle 8, Versuch 1 und 2).
- (iii) Innerhalb dieser Grenzen stimmt die Zusammensetzung von freigesetzten und in der Lysoverbindung nachweisbaren Fettsäuren nach partieller und vollständiger Umsetzung überein (Tabelle 7, 1- und 4stdge Spaltung). Eine vollständige Umsetzung ist deshalb bei schwer spaltbaren Verbindungen nicht erforderlich (vgl. Tabelle 6).
- (iv) Bei mehr oder weniger zufallsbedingter Verteilung der Fettsäuren auf beide Positionen des Glycerinanteiles ist die Zusammensetzung der freigesetzten Fettsäuren mit der für Position 1 aus dem Gesamtlipid und der Lysoverbindung berechneten identisch (Tabelle 7, Spalte 5, 6 und 7, 8).
- (v) Bei stark asymmetrischer Verteilung der Fettsäuren stimmen die für Position 1 gefundenen mit dem berechneten Werte nicht überein (Tabelle 8, Spalte 7 und 8). Die Ursache liegt darin, daß bei Spaltung mit allen 1-positionsspezifischen Lipasen durch spontane Acylwanderung Fettsäuren aus Position 2 in die freigewordene Position 1 gelangen und dort von der Lipase, wenn auch verlangsamt, abgespalten werden (61, 66, 67). Im Beispiel der Tabelle 8 ist dies besonders deutlich für Hexadecansäure, die fast ausschließlich in Position 2 gebunden ist und 60 % der hier befindlichen Fettsäuren stellt.

Da keine bevorzugte Abspaltung bestimmter Fettsäuren erfolgt, gibt die Lysoverbindung die Fettsäurezusammensetzung in Position 2, unabhängig von der Reaktionsdauer (Tabelle 7, Spalte 3, 4), unverfälscht wieder (61). In Fällen asymmetrischer Verteilung wurde des-

halb die Zusammensetzung von Position 1 als Differenz zwischen Gesamtfettsäuren und den Fettsäuren der Lysoverbindung ermittelt.

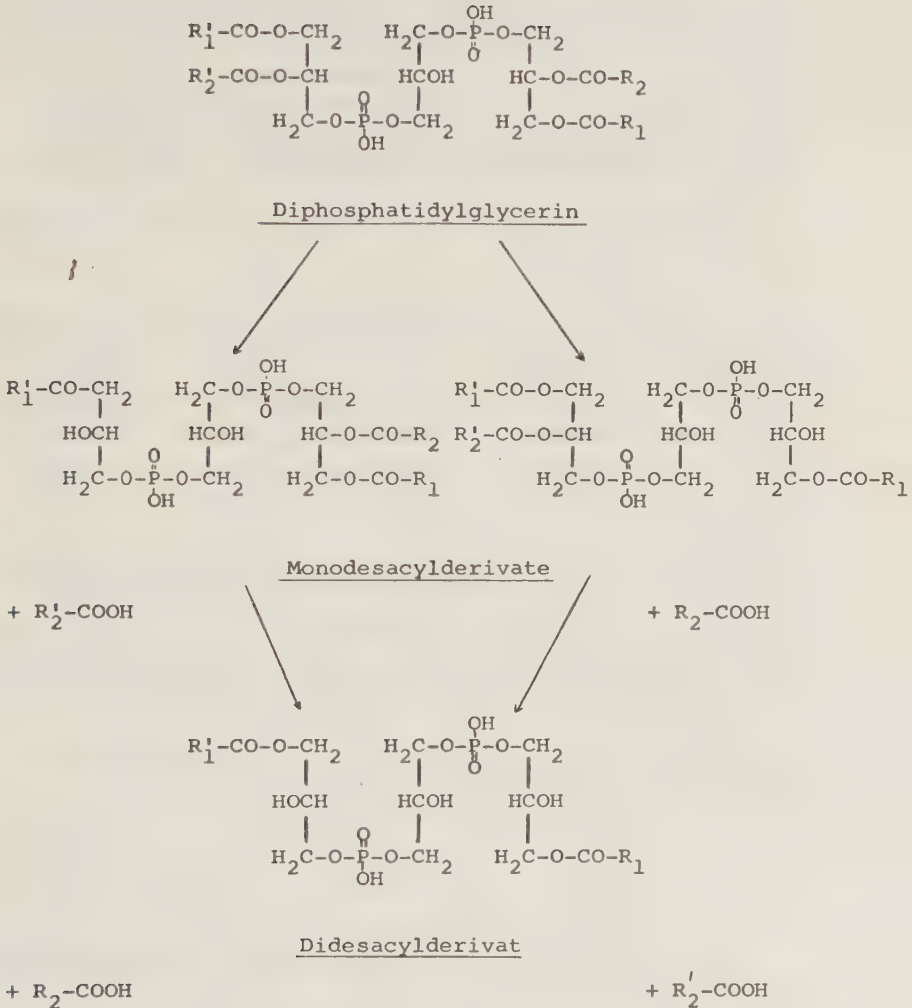
IV.2 Analyse der Fettsäureverteilung in Phospholipiden mit Phospholipase A₂

Die Verteilung der Fettsäuren im Phosphatidylanteil von Phospholipiden hätte sich ebenfalls mit Rhizopulipase durchführen lassen (61, 63). Um jedoch das Problem der Acylwanderung zu vermeiden, verwendeten wir Phospholipase A₂ (Phosphatid-Acylhydrolase, EC 3.1.1.4), welche die Fettsäure aus Position 2 des Phosphatidylanteiles abspaltet (68, 69).

Aus Diphosphatidylglycerin werden durch das Enzym nacheinander die Fettsäuren aus Position 2 beider Phosphatidylreste abgespalten, wodurch über das Monodesacylderivat die Didesacylverbindung als Endprodukt erhalten wird (Schema 14). Man ermittelt auf diese Weise die mittlere Fettsäureverteilung der beiden Phosphatidylgruppen.¹⁾

In Tabelle 9 und 10 ist die Verteilungsanalyse für ein Phosphatidyl- und ein Diphosphatidylglycerin als Beispiel gegeben. Zur Kontrolle wurde aus der Zusammensetzung der freigesetzten Fettsäuren und der in der Lysoverbindung gefundenen die Zusammensetzung der Ausgangsverbindung berechnet. Die berechneten stimmen mit den gefundenen Werten überein (Spalte 4 und 1). Das zeigt, daß, wie aus sterischen Gründen zu erwarten, in der Lysoverbindung eine Acylwanderung von Position 1 nach 2 und anschließende Abspaltung der ursprünglich aus Position 1

¹⁾Eine getrennte Analyse wäre mit Hilfe der Phospholipase D aus *Haemophilus parainfluenzae* möglich, welche Diphosphatidylglycerin in Phosphatidsäure und Phosphatidylglycerin spaltet (70). Die Fettsäureverteilung in den Spaltprodukten kann dann mit Phospholipase A₂ ermittelt werden.



Schema 14: positionsspezifische Fettsäureabspaltungen aus Diphosphatidylglycerin mit Phospholipase A₂.

Tab. 9: Fettsäureverteilungsanalyse an Phosphatidylglycerin aus *Streptococcus lactis* mit Phospholipase A₂ aus *Crotalus terrificus terrificus*.

2,4 Mol Lipid wurden in 0,8 ml Diäthyläther gelöst, mit 1,5 ml 0,05 Collidin-HCl-Puffer, pH 7,5 (enthaltend 10 mM Calciumchlorid) und 0,15 ml Enzym (30 U) versetzt. Der Ansatz wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, wonach die Spaltung vollständig war. Angaben in Mol %.

	1	2	3	4
		freigesetzte	Lyso-	
	GESAMTLIPID	Fettsäuren	verbindung	GESAMTLIPID ^{a)}
FETTSÄUREN	gefunden	Pos. 2	Pos. 1	berechnet
14:0	15,2	28,6	n.a.	14,3
14:1	2,2	6,2	n.a.	3,1
16:0	19,8	32,7	5,9	19,3
16:1	19,1	24,2	10,8	17,5
18:0	n.a.	n.a.	1,6	n.a.
18:1	43,7	8,3	81,7	45,0

Tab. 10: Fettsäureverteilungsanalyse an Cardiolipin aus *Streptococcus faecalis* var. *faecalis* mit Phospholipase A₂ aus *Crotalus terr. terr.*

Ansatz und Inkubation wie in Tabelle 9. Reaktionsdauer bis zur vollständigen Spaltung in das Didesacylderivat 14 Stunden. Angaben in Mol%.

	1	2	3	4
		freigesetzte	Lyso-	
	GESAMTLIPID	Fettsäuren	verbindung	GESAMTLIPID ^{a)}
FETTSÄUREN	gefunden	Pos. 2	Pos. 1	berechnet
14:0	8,9	16,5	1,9	9,2
14:1	0,6	1,4	n.a.	0,7
16:0	29,2	50,3	7,2	28,8
16:1	11,2	17,0	4,2	10,6
18:0	1,9	0,5	3,6	2,1
18:1	24,9	14,9	35,8	25,2
19 _{cy}	23,2	n.a.	47,4	23,7

a) berechnet als halbe Summe der freigesetzten und in der Lysoverbindung gefundenen Fettsäuren

Tab. 11: Eigenschaften der Phospholipase A₂ aus *Crotalus terrificus terrificus* und Schweinepankreas nach Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim GmbH). Zur Spezifität, siehe Literatur (63, 72).

	PHOSPHOLIPASE A ₂ Crotalus terr.terr.	PHOSPHOLIPASE A ₂ Schweinepankreas
Spezifische Aktivität	200 U/mg, 25° C Lecithin als Substrat	800 U/mg, 40° C Lecithin als Substrat
mg/ml	1 mg/ml in 50 % Glycerin	10 mg/ml Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfatlösung pH ca. 5,5
Substratspezifität	bevorzugt zwitterionische Phospholipide	bevorzugt anionische Phospholipide
CaCl ₂	essentiell	essentiell

Tab. 12: Vergleich der Spaltbarkeit von Phospholipiden und Phosphoglucolipiden durch Phospholipase A₂ aus *Crotalus terr.terr.* (a) und Schweinepankreas (b). Die Spaltung mit Schlangengiftenzym erfolgte in 0,05 M Collidin-HCl-Puffer, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, mit Pankreasenzym in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,3, 30 mM CaCl₂. Die Lipide waren in Diäthyläther gelöst.

SUBSTRAT		Substrat Mol/0,5ml Äther	Enzym U/ml Puffer	Inkuba- tion (Std.n.)	Spaltung %
Phosphatidyl- glycerin	a	1,1	5	6	90
	b	1,5	200	0,5	100
Cardiolipin	a	0,8	5	12	100
	b	1,0	200	1,5	100
Phosphogluco- lipid I	b	1,0	200	3	100
Phosphogluco- lipid II	b	1,0	200	3	100
Phosphogluco- lipid III	a	1,7	17	24	50
	b	1,0	200	3	100
Phosphogluco- lipid IV	b	0,2	200	2-3	100
Phosphogluco- lipid VI	b	0,08	600	14	100

Tab. 13:Vergleichende Fettsäureverteilungsanalyse an Diphosphatidylglycerin aus Streptococcus haemolyticus mit Phospholipase A₂ aus Crotalus terr. terr. und Schweinepankreas. Reaktionsbedingungen und Inkubationszeiten wie in Tabelle 12.Diphosphatidylglycerin war in beiden Ansätzen vollständig in das Didesacylderivat gespalten. Angaben in Mol%.

FETTSÄUREN	GESAMTLIPID	PHOSPHOLIPASE A ₂ aus SCHLANGENGIFT		PHOSPHOLIPASE A ₂ aus SCHWEINEPANKREAS	
		freigesetzte Fettsäuren Pos.2	Lyso- verbindung Pos.1	freigesetzte Fettsäuren Pos.2	Lyso- verbindung Pos.1
12:0	4,2	11,1	0,9	10,0	n.a.
14:0	12,1	27,1	3,4	26,3	2,2
16:0	36,5	31,1	41,9	30,3	44,7
16:1	25,1	20,6	27,3	21,9	28,5
18:0	2,3	n.a.	4,8	0,8	3,2
18:1	19,8	10,1	21,6	10,6	21,4

stammenden Fettsäuren nicht erfolgt. Am deutlichsten wird dies an der C₁₉-Cyclopropansäure des Diphosphatidylglycerins (Tabelle 10). Freigesetzte Fettsäuren und Lysoverbindung geben somit die Zusammensetzung in Position 2 und 1.

Anfänglich wurde Phospholipase A₂ aus *Crotalus terr.terr.*, später Phospholipase A₂ aus Schweinepankreas (72) verwendet. Das Pankreasenzym besitzt eine höhere spezifische Aktivität und spaltet bevorzugt anionische Lipide (Tabelle 11), wodurch sich für alle geprüften Verbindungen die Reaktionsdauer beträchtlich verkürzt (Tabelle 12). Besonders deutlich wird dieser Unterschied für die schwer angreifbaren Phosphoglucolipide, deren vollständige Umsetzung nur mit dem Pankreasenzym möglich war (Tabelle 12, Phosphoglucolipid III). Daß Phospholipase A₂ aus Schlangengift und Pankreas dasselbe Fettsäureverteilungsmuster liefern, zeigt die vergleichende Analyse von Diphosphatidylglycerin aus *Streptococcus haemolyticus* in Tabelle 13.

IV.3 Analyse der Fettsäureverteilung in Phosphoglucolipiden

Die Analyse der Fettsäureverteilung auf die vier Positionen der phosphatidylhaltigen Phosphoglucolipide stellte ein besonderes Problem dar, da positionsspezifische Acylhydrolasen für die selektive Abspaltung aus den vier Positionen nicht bekannt sind.

Im folgenden werden zwei Abbauege beschrieben, die beide auf einer chemischen Spaltung der Phosphodiesterbindung beruhen und dadurch eine getrennte Analyse der

Fettsäuren im Phosphatidyl- und Glykolipidanteil ermöglichen. Eine enzymatische Spaltung der Phosphodiesterbindung ist bislang nicht möglich, da Phosphoglucolipide von Phospholipase C und D nicht umgesetzt werden (22).

IV.3.1 Kombinierter Abbau mit 60 proz. (g/v) HF, Phospholipase A₂ und Rhizopuslipase.

Die Reaktionen dieses Abbauweges sind in Schema 15 zusammengestellt. Die Phosphodiester-spaltung erfolgt mit 60 proz. (g/v) HF, einem Verfahren, das bereits zur Phosphodiesteröffnung von Nucleinsäuren, Teichonsäuren (vgl. 73), Lipoteichonsäuren (10) und Glycerophosphoryldigluco-syldiglycerid (24, 25) eingesetzt worden war. Dabei hatte sich gezeigt, daß glykosidische Bindungen und Fettsäureesterbindungen im wesentlichen intakt bleiben (19,24). Da Phosphomonoester rascher als Diester gespalten werden, wird der ursprünglich als Phosphodiester gebundene Phosphor als Orthophosphat freigesetzt. Aus den Phosphoglucolipiden entstand dementsprechend das jeweilige Glykolipid (Tabelle 14) sowie Diglycerid aus dem Phosphatidyl- und Glycerin aus dem Glycerophosphorylanteil (Tabelle 14). Da neben 1,2- auch 1,3-Diglycerid nachweisbar ist, ist auf eine Acylwanderung während der Spaltung oder Aufarbeitung zu schließen.

Glycerinphosphat wird leichter abgespalten als Phosphatidylreste: Phosphoglucolipid V und VI wurden in 18 Stdn. vollständig umgesetzt, wobei Phosphoglucolipid VI neben α -Kojibiosyldiglycerid Phosphoglucolipid III lieferte. Bei Phosphoglucolipid I - IV waren auch nach 24 bis 28 Stdn. 20 bis 40 % an ungespaltenen Ausgangsverbindungen nachweisbar. Da bei unvollständigem Abbau keine Selektionierung hinsichtlich der

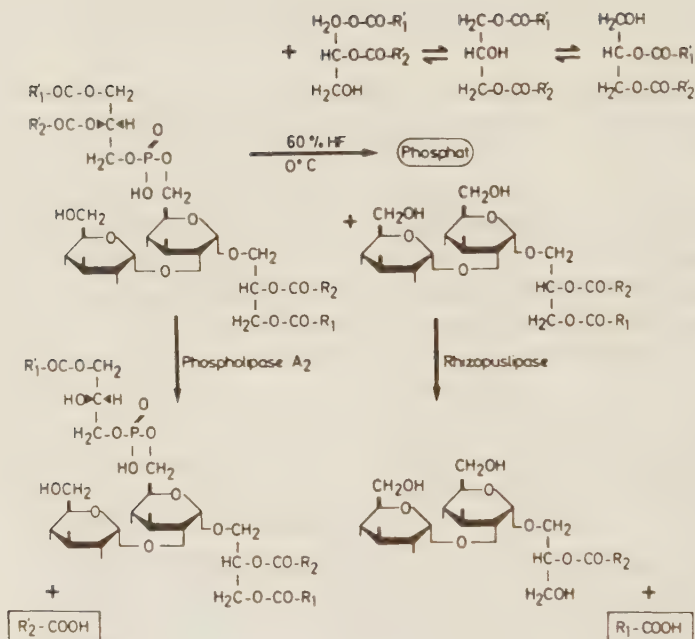
Tab. 14: Hauptsächliche Spaltprodukte der Phosphoglucolipide bei Abbau mit 60 proz. (g/v) HF. Pi, Orthophosphorsäure.

Ausgangs- verbindung	Spaltprodukte			
Phospho- glucolipid I	MONOGLUCOSYL- diglycerid	Pi	Diglyceride	
Phospho- glucolipid II	DIGLUCOSYL- diglycerid	Pi	Diglyceride	
Phospho- glucolipid III	DIGLUCOSYL- diglycerid	Pi	Diglyceride	
Phospho- glucolipid IV	TRIGLUCOSYL- diglycerid	Pi	Diglyceride	
Phospho- glucolipid V	DIGLUCOSYL- diglycerid	Pi	-	GLYCERIN
Phospho- glucolipid VI	DIGLUCOSYL- diglycerid	Pi	Diglyceride	GLYCERIN

Fettsäurezusammensetzung erfolgt (s. unten), wurde der intakt gebliebene isolierte Rest nur dann einem zweiten Abbau unterworfen, wenn es von der Substanzmenge her erforderlich war.

Neben den Hauptabbauprodukten (Tabelle 14) wurden kleinere Mengen an Lysoverbindungen der intakt gebliebenen Phosphoglucolipide und der aus ihnen freigesetzten Glykolipide gefunden, so daß auch Fettsäureester in geringem Ausmaß gespalten werden.

Nach Abbau mit HF und anschließender Trennung der Lipid-Abbauprodukte durch präparative Dünnschichtchromatographie konnte die Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidyl- und Glykolipidanteils getrennt analysiert werden. Die Verteilungsanalyse im isolierten Glykoli-



Schema 15: Kombiniertes Abbau von Phosphoglucolipid III mit 60 proz. (g/v) HF, Phospholipase A₂ und Rhizopuslipase. Nach jedem Abbauschritt wurden die Produkte durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert.

pidanteil erfolgte dann, wie beschrieben, mit Hilfe von Rhizopuslipase (Schema 15). Zur Verteilungsanalyse im Phosphatidylanteil wurden die Phosphoglucolipide mit Phospholipase A₂ abgebaut, wodurch die Fettsäuren aus Position 2 des Phosphatidylanteils erhalten wurden

Tab. 15: Stabilität der Fettsäuren von Phosphoglucolipid III aus *Streptococcus faecalis* var. *faecalis* bei Behandlung mit 60 proz. (g/v) HF (24 h, 0 °C). a) Fettsäuren aus Phosphoglucolipid III, b) als Methylester mit HF behandelt, c) Fettsäuren aus nach HF-Abbau intakt gefundenem Phosphoglucolipid III. Angaben in Mol %.

FETTSÄUREN	a	b	c
14:0	5,9	5,6	5,1
16:0	30,7	30,3	31,0
16:1	11,4	11,6	10,5
18:0	2,6	2,3	2,9
18:1	30,8	31,4	31,7
19 _{cy}	18,5	18,4	18,9

(Schema 15). Die Fettsäuren in Position 1 wurden als Differenz der Fettsäuren des mit HF freigesetzten Diglycerids und den mit Phospholipase A₂ erhaltenen Fettsäuren berechnet. Wie unten gezeigt wird, ist das nach HF-Abbau isolierbare 1,2-Diglycerid für die Verteilungsanalyse unbrauchbar.

Nach den Ergebnissen in Tabelle 15 sind sowohl ungesättigte Fettsäuren als auch Cyclopropansäuren bei Behandlung mit HF stabil, so daß nach Abbau der Lipide mit HF ein unverändertes Fettsäuremuster erhalten wird.

Als Beispiel einer kompletten Analyse sind in Tabelle 16 und 17 die mit Phosphoglucolipid III aus *S.lactis* gewonnenen Ergebnisse zusammengestellt:

- (i) Das nach Abbau mit Phospholipase A₂ und 60 % HF intakt gebliebene Phosphoglucolipid (Tabelle 16/2 und 3) zeigt im wesentlichen dieselbe Fettsäurezusammensetzung wie die Ausgangsverbindung (Tabelle 16/1). Somit tritt durch unvollständigen

Tab. 16: Analyse der Fettsäureverteilung in Phosphoglucolipid III aus *S.lactis* nach kombiniertem Abbau mit HF und Phospholipase A₂ entsprechend Schema 15. Angaben in Mol %.

FETTSÄUREN	gefunden		3	4	5	6	7	8	9	10	11
	a)	b)									
14:0	9,5	6,5	8,4	9,6	9,3	12,3	6,9	23,5	4,6	10,4	3,4
14:1	1,4	3,4	1,2	0,6	0,7	1,3	n.a.	2,8	n.a.	0,6	n.a.
16:0	22,4	20,3	24,6	25,0	24,0	22,2	27,7	35,7	20,1	50,9	4,5
16:1	17,7	20,9	19,2	17,8	17,9	18,2	17,5	23,1	16,1	24,6	10,4
18:1	49,0	48,9	46,7	47,0	46,1	46,1	47,9	14,8	59,2	13,6	82,2

72

a) Phosphoglucolipid III

b) Phosphoglucolipid III, intakt gefunden nach Abbau mit Phospholipase A₂.

c) Phosphoglucolipid III, intakt gefunden nach Abbau mit HF.

d) berechnet aus den nach Abbau mit HF im Diglucosyldiglycerid und Diglycerid gefundenen Fettsäuren (Spalte 7,6).

e) berechnet aus den nach Abbau mit Phospholipase A₂ freigesetzten Fettsäuren und in der Lysoverbindung gefundenen Fettsäuren (Spalte 8,9).

f) berechnet aus den Fettsäuren des durch HF-Abbau freigesetzten Diglucosyldiglycerids (Spalte 7) und den nach Rhizopuslipase-Abbau des Diglucosyldiglycerids in der Lysoverbindung gefundenen Fettsäuren (Spalte 10).

Tab. 17: Analyse der Fettsäurezusammensetzung und -verteilung in dem nach HF-Abbau aus Phosphoglucolipid III von *S. lactis* freigesetzten 1.2-Diglycerid. Zum Vergleich ist die durch HF-Abbau und Spaltung mit Phospholipase A₂ ermittelte Fettsäureverteilung des Phosphatidylrestes gegeben. Werte in Mol %.

1	2	3	4	5	6
	Diglyceride nach Abbau mit HF	Rhizopuslipase- Abbau			Verteilung der Fettsäuren im Phosphatidyl-Anteil a)
Fettsäuren	1.2-Diglycerid	des 1.2-Diglycerides	Monoglycerid Fettsäuren (Pos.2)	(Pos.1)	(Pos.2)
	1.3-Diglycerid	1.3-Diglycerid			
14:0	12,3	12,3	11,1	12,6	23,5
14:1	1,3	1,5	1,3	2,1	2,8
16:0	22,2	24,6	25,6	23,4	35,7
16:1	18,2	17,7	18,7	17,3	23,1
18:1	46,1	43,3	43,6	44,6	14,8
					77,4

a) Pos. 2: Fettsäuren durch Phospholipase A₂ aus Phosphoglucolipid III freigesetzt (vgl. Tab. 16).

Pos. 1: berechnet als Differenz der nach HF-Abbau in den Diglyceriden gefundenen (Spalte 1) und der durch Phospholipase A₂ freigesetzten Fettsäuren (Spalte 5).

Abbau keine Selektionierung im Fettsäuremuster auf. Auch der geringfügige Verlust durch die beim HF-Abbau entstehenden Lysoverbindungen bleibt ohne Einfluß.

- (ii) Dementsprechend stimmt das nach HF-Abbau aus dem erhaltenen Diglycerid und Diglucosyldiglycerid berechnete Fettsäuremuster der Ausgangsverbindung (Tabelle 16, 4) mit dem gefundenen innerhalb der Fehlergrenzen überein.
- (iii) Dasselbe trifft zu, wenn man nach Abbau mit Phospholipase A₂ aus den abgespaltenen Fettsäuren (Tabelle 16/8 und 9) auf die Fettsäuren der Ausgangsverbindung zurückrechnet (Tabelle 16/5).
- (iv) Analysiert man mit Rhizopuslipase die Positionsverteilung der Fettsäuren im nach HF-Abbau isolierten 1,2-Diglycerid, wird eine völlig symmetrische Verteilung gefunden (Tabelle 17/3 und 4). Im Gegensatz hierzu zeigt das über die Analyse mit Phospholipase A₂ erhaltene Ergebnis eine asymmetrische Fettsäureverteilung im Phosphatidylanteil (Tabelle 17/5 und 6), wie sie für alle Lipide aus *S.lactis* charakteristisch ist (z. B. Tabelle 16/10 und 11).

Wir schließen daraus, daß das beim Abbau mit HF ursprünglich freigesetzte 1,2-Diglycerid (Schema 15) nicht nur ins 1,3-Isomer übergeht, sondern durch mehrfache Umacylierung randomisiert und damit für die Fettsäureverteilungsanalyse im Phosphatidylanteil unbrauchbar ist.

IV.3.2 Kombinierter Abbau der Phosphoglucolipide mit Phospholipase A₂, 98 proz. Essigsäure und Rhizopuslipase.

Der für die Verteilungsanalyse im Phosphatidylanteil notwendige Abbau der Phosphoglucolipide mit Phospholipase A₂ führte zu einer zweiten, in Schema 16 wiedergegebenen Abbausequenz.

Durch Abspaltung der Fettsäuren mit Phospholipase A₂ entsteht in den Phosphoglucolipiden eine dem Phosphatdiester benachbarte freie Hydroxylgruppe, wodurch die Diesterbindung der Spaltung mit 98 % (v/v) Essigsäure zugänglich wird (74). Die freie Hydroxylgruppe ist notwendig, da die Spaltung über ein cyclisches Phosphat erfolgt (74). Fettsäureester werden, wie ursprünglich beim Abbau von Cardiolipin gezeigt (75), dabei nicht gespalten. Da alle Phosphoglucolipide aus *Streptococcus* den Phosphodiester an C-6 einer Glucopyranosyleinheit tragen, erfolgt die Spaltung selektiv über Cyclisierung am Glycerinanteil, wodurch die Glykolipidanteile einheitlich als solche freigesetzt und Phosphatderivate nicht gefunden werden (Abbildung 12, C, D). Als phosphathaltige Abbauprodukte findet man bei Phosphoglucolipid V ein Gemisch von Glycerinphosphaten (22), beim Abbau der durch Phospholipase A₂ erhaltenen Lysoverbindungen von Phosphoglucolipid I - IV entsprechend Lysophosphatidsäure (Abbildung 12, C). Lysophosphatidsäure und freigesetzte Glykolipide sind dünn-schichtchromatographisch gut trennbar (Abbildung 12, C). Die Spaltung mit Essigsäure kann so durchgeführt werden, daß sie vollständig abläuft (Abbildung 12, C, D).

Lysoglykolipide treten nicht auf, was die Stabilität der Fettsäureesterbindungen unter den Reaktionsbedingungen bestätigt. Auch glykosidische Bindungen erwiesen sich als stabil (22). Ein geringer Anteil der Glykolipide wird jedoch partiell acetyliert (22), wodurch



Nach jedem Abbauschritt wurden die Reaktionsprodukte durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert.

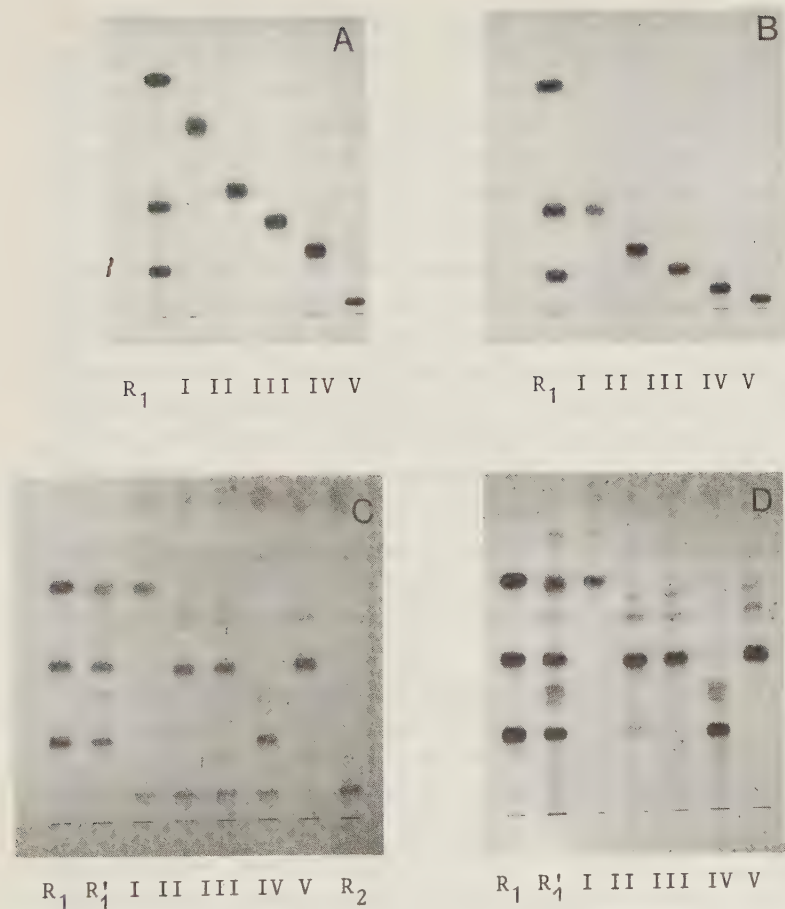


Abb. 12: Sequentieller Abbau der Phosphoglucolipide mit Phospholipase A₂ und Essigsäure.

I-IV: Phosphoglucolipid I-IV; A: intakt, B: nach Phospholipase A₂, C,D: nach Phospholipase A₂ und Essigsäure

V: Phosphoglucolipid V; A u. B: unbehandelt, C,D: nach Essigsäure.

R₁: Mono-, Di- und Triglycosyldiglycerid; R₁': dieselben Verbindungen nach Essigsäure; R₂: Lysophosphatidsäure

Kieselgel-Fertigplatte (Merck). Entwicklung bei A und B: Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser 50:20:10:10:5 (p. Vol.), bei C und D: Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 (p. Vol.). Färbung: α -Naphthol-Schwefelsäure (A,B,D), Jod-dampf (C).

chromatographisch rascher wandernde Nebenprodukte entstehen (Abbildung 12, C, D). Schrittweise Erhöhung des Wasseranteils im Reaktionsgemisch verhinderte die Acetylierung nicht, verlängerte jedoch die Reaktionszeit und führte schließlich zu einer geringen, langsam zunehmenden Spaltung von Fettsäureestern und glykosidischen Bindungen (22).

Wie Schema 16 zeigt, erhält man bei diesem Abbau die Fettsäuren aus Position 2 des Phosphatidylanteils durch Spaltung mit Phospholipase A_2 , die Fettsäuren aus Position 1 in Form der durch Essigsäure freigesetzten Lysophosphatidsäure. Die Fettsäuren des Glykolipidanteils werden am freigesetzten Glykolipid, ihre Positionsverteilung nach Abbau mit Rhizopuslipase bestimmt.

Zum Vergleich der beiden Abbausequenzen wurde Phosphoglucolipid III aus *S.faecalis* nach Schema 15 und 16 abgebaut. Die in Tabelle 18 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen:

- (i) Die auf beiden Wegen erhaltenen Spaltprodukte ergeben eine berechnete Fettsäurezusammensetzung der Ausgangsverbindung (Tabelle 18/2 und 3), die mit der gefundenen übereinstimmt (Tabelle 18/1). Der Verlust, der durch partielle Acetylierung der Produkte beim Abbau mit Essigsäure entsteht, führt nicht zur Selektionierung und Verfälschung des Fettsäuremusters der Abbauprodukte.
- (ii) Dementsprechend stimmt die Zusammensetzung der Diglucosyldiglyceride, die auf beiden Wegen erhalten wurden, hinreichend überein (Tabelle 18/4 und 8).
- (iii) Dasselbe gilt für den Phosphatidylrest, dessen Zusammensetzung direkt bestimmt (Tabelle 18/5) und aus den in beiden Positionen gefundenen Werten berechnet wurde (Tabelle 18/11).

Tab. 18: Vergleich der Fettsäureverteilungsanalyse von Phosphoglucolipid III aus Streptococcus faecalis, 1) mit HF und Phospholipase A₂ (Schema 15) und 2) mit Phospholipase A₂ und nachfolgender Spaltung mit Essigsäure (Schema 16). Angaben in Mol. %

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
			Abbau mit HF und PHOSPHO-LIPASE A ₂				Abbau mit PHOSPHOLIPASE A ₂ und ESSIGSÄURE				
GESAMTLIPID			DGDG- Phosphatidyl-Rest				DGDG- Phosphatidyl-Rest				
gefunden berechnet			Anteil total Pos.2 Pos.1				Anteil Pos.2 Pos.1 total				
a) c)			d)				b)				
14:0	5,9	6,3	5,6	6,0	6,7	11,4	2,0	4,5	13,0	0,2	6,6
16:0	30,7	30,6	31,3	30,2	31,0	53,9	8,1	32,8	51,8	7,9	29,8
16:1	11,4	10,8	10,0	10,7	10,9	18,6	3,2	9,2	18,3	3,1	10,7
18:0	2,6	2,3	2,3	2,3	2,3	1,3	3,3	2,5	1,4	2,9	2,2
18:1	30,8	31,6	32,1	34,8	28,3	15,0	41,6	35,2	15,0	42,9	28,9
19 _{cy}	18,5	18,2	18,3	15,5	20,9	-	41,8	15,3	-	42,9	21,4

- a) berechnet aus den nach Abbau mit HF im Diglucosyldiglyceridanteil und Diglyceridanteil gefundenen Fettsäuren.
- b) berechnet aus den mit Phospholipase A₂ freigesetzten (Position 2) und den nach Essigabbau in Lysophosphatidsäure (Position 1) gefundenen Fettsäuren.
- c) berechnet aus den nach Abbau mit Essigsäure im Diglucosyldiglyceridanteil gefundenen und den für den Phosphatidylrest nach b) berechneten Fettsäuren.
- d) berechnet aus den im Diglyceridanteil nach Abbau mit HF gefundenen und den aus dem intakten Phosphoglucolipid durch Phospholipase A₂ abgespaltenen Fettsäuren.

Man erhält somit auf beiden Wegen übereinstimmende und zuverlässige Ergebnisse. Wir bevorzugen den Abbau nach Schema 16, da die Spaltung mit Essigsäure vollständig erfolgt, einfacher und zeitsparender ist, weniger Nebenverbindungen entstehen und die Fettsäuren aus Position 1 des Phosphatidylanteils direkt bestimmbar sind.

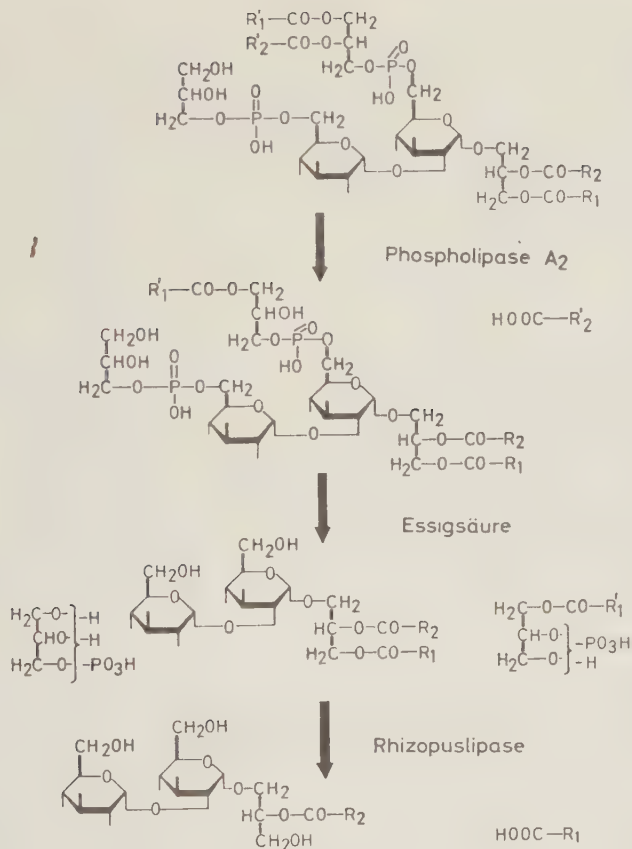
IV.3.3 Analyse der Fettsäureverteilung in Phosphoglucolipid VI

Phosphoglucolipid VI nimmt eine Sonderstellung ein, da es sowohl einen Glycerinphosphat- als auch einen Phosphatidylrest enthält (vgl. Schema 17). Nachdem es gelang, mit hoher Enzymkonzentration und entsprechender Reaktionszeit (Tabelle 12) das Lipid und Phospholipase A₂ in die Lysoverbindung zu überführen, konnte der weitere Abbau entsprechend Schema 17 erfolgen. Erwartungsgemäß wurde mit Essigsäure der Glycerinphosphat- und Lysophosphatidylrest abgespalten und α -Kojibiosyldiglycerid freigesetzt (Schema 17). Letzteres wurde wieder mit Rhizopuslipase analysiert. Zur Ermittlung der Fettsäuren im Phosphatidyl- und Diglucosyldiglyceridanteil wurde Phosphoglucolipid VI (1 μ mol) zusätzlich mit HF abgebaut.

Die in Tabelle 19 wiedergegebenen Fettsäureanalysen zeigen die Zuverlässigkeit der Methode.

IV.4 Analyse der Fettsäureverteilung in Acylphosphatidylglycerin

Versuche, diese Verbindung zur Fettsäureanalyse mit Phospholipase D in Phosphatidsäure und Monoglycerid zu spalten, mißlangen, was auch für Diphosphatidylglycerin und Bisphosphatidsäure beschrieben ist (69, 76, 77).



Schema 17: Abbau von Phosphoglucolipid VI zur Analyse der Fettsäurepositionsverteilung mit Hilfe von Phospholipase A_2 , 98 proz. Essigsäure und Rhizopuslipase.

Nach jedem Abbauschritt wurden die Reaktionsprodukte durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert.

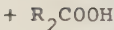
Tab. 19: Fettsäureverteilungsanalyse von Phosphoglucolipid VI aus *Streptococcus faecalis* var. *faecalis*. Die Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylanteiles und des Diglucosyldiglyceridanteiles wurden durch Abbau mit HF bestimmt. Zur Analyse der Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der zwei Glycerinanteile wurde Phosphoglucolipid VI nach Schema 17 abgebaut. Werte in Mol %

FETTSÄUREN	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	GESAMTLIPID			Phosphatidylanteil		DGDG-Anteil			
	gefunden	berechnet a)	b)	total	Pos.1	Pos.2	total	Pos.2	Pos.1 c)
14:0	5,7	4,2	4,5	5,1	-	11,4	3,2	5,8	0,6
16:0	28,4	30,7	28,2	31,6	7,4	46,1	29,7	55,0	4,4
16:1	10,4	9,5	10,7	8,2	2,2	19,0	10,8	18,0	3,6
18:0	1,7	2,5	2,7	2,1	2,9	2,2	2,9	1,7	4,1
18:1	39,7	40,1	40,1	33,6	49,0	18,5	46,5	19,5	73,5
19 _{cy}	14,0	13,0	13,7	19,3	38,4	2,7	6,7	-	13,4

a) berechnet aus den nach Abbau mit HF im Diglucosyldiglycerid und Diglycerid gefundenen Fettsäuren (Spalte 4, 7).

b) berechnet aus dem nach Abbau mit HF erhaltenen Diglucosyldiglyceridanteil und den mit Phospholipase A₂ freigesetzten Fettsäuren (Position 2) und den nach Essigsäureabbau in Lysophosphatidsäure (Position 1) gefundenen Fettsäuren (Spalte 5, 6, 7).

c) berechnet aus den nach Abbau mit HF im Diglucosyldiglyceridanteil (Spalte 7) und den nach Spaltung mit Rhizopuslipase in der Lysoverbindung vom Diglucosyldiglyceridanteil gefundenen Fettsäuren (Spalte 8).



Entsprechend Schema 18 wurde deshalb zur Diesterspaltung 98 % Essigsäure verwendet, wonach die Fettsäuren im Di- und Monoglyceridanteil analysiert werden konnten (Tabelle 20/4 und 7). Die Fettsäuren aus Position 2 des Diglyceridanteils wurden nach vollständigem Umsatz des Acylphosphatidylglycerins mit Phospholipase A₂ ermittelt (Tabelle 20/5), die in Position 1 als Differenz zwischen den im Diglyceridanteil gefundenen und mit Phospholipase A₂ abgespaltenen Fettsäuren berechnet (Tabelle 20/6). Auch für diesen Abbau wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den aus den Spaltprodukten für das Gesamtlipid berechneten und den direkt ermittelten Werten gefunden (Tabelle 20/2, 3 und 1).

Tab. 20: Fettsäureverteilungsanalyse in Acylphosphatidylglycerin aus *Streptococcus haemolyticus* D-58. Der Abbau erfolgte nach Schema 18. Angaben in Mol %.

FETTSÄUREN	1	2	3		4	5	6	7	8
	GESAMTLIPID				Diglyceridanteil		Monoglycerid- anteil		Lyso-Acyl- PG nach Phos- pholipase A ₂
	gefunden	berechnet	a)	b)	total	Pos.2	Pos.1	Pos.1	
12:0	5,2	4,7	4,7	4,7	6,1	12,0	0,3	1,9	1,1
14:0	12,2	13,3	11,8		13,8	23,2	4,3	12,3	6,3
16:0	31,6	32,8	35,6		25,6	28,4	22,9	47,3	39,1
16:1	32,8	29,8	26,8		36,3	24,8	47,8	16,8	27,8
18:0	1,4	1,4	2,7		1,1	2,0	0,3	2,1	3,1
18:1	16,9	19,0	18,4		18,7	9,8	27,7	19,5	22,8

a) berechnet aus dem Di- und Monoglyceridanteil (Spalte 4,7) nach Abbau mit Essigsäure.

b) berechnet aus freigesetzten Fettsäuren (Position 2) und Lysoverbindung nach Spaltung mit Phospholipase A₂.

c) berechnet aus Diglycerid (Spalte 4) und den durch Phospholipase A₂ freigesetzten Fettsäuren (Spalte 5).

V. ZUSAMMENSETZUNG UND POSITIONSVERTEILUNG DER FETT-SÄUREN IN DEN POLAREN LIPIDEN VERSCHIEDENER STREPTOCOCCENSTÄMME

V.1 Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren in den polaren Lipiden von Streptococcus faecalis var. faecalis und Streptococcus faecalis var. zymogenes.

In Tabelle 21 ist das Fettsäuremuster einiger Stämme von Streptococcus faecalis (Serogruppe D) aufgeführt, wie man es durch Desacylierung der Lipidrohextrakte erhält. Es zeigt die für die Familie der Lactobacteriaceae charakteristische Zusammensetzung (3, 78): Die Reihe der gesättigten Fettsäuren ist vorwiegend durch Hexadecansäure, sowie durch geringere Anteile an Tetra- und Octadecansäure vertreten; die Reihe der ungesättigten Fettsäuren durch Hexadecen-, namentlich aber Octadecensäure, während Tetradecensäure nur in oft kaum auswertbaren Spuren auftritt. Als weiteres Charakteristikum findet sich C₁₉-Cyclopropansäure (cis-11,12-Methylenoctadecansäure), die aus Octadecensäure durch Methyltransfer aus Adenosylmethionin gebildet wird (3). Trotz Vorhandenseins von Hexadecensäure konnte die entsprechende C₁₇-Cyclopropansäure nicht nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (10, 33, 79) fehlen Fettsäuren mit ungerader C-Zahl, verzweigtkettige Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren.

Allen in Tabelle 21 aufgeführten Stämmen ist gemeinsam, daß über 80 % der Fettsäuren aus Hexadecen-, Octadecen- und C₁₉-Cyclopropansäure bestehen. Der Gehalt der einzelnen Fettsäuren variiert innerhalb der Stämme in unterschiedlicher Weise. Diese Unterschiede können wenigstens teilweise durch geringfügig verschiedene Wachstumsbedingungen verursacht sein, da z. B. Wachs-

Tab. 21: Fettsäurezusammensetzung der Lipidextrakte verschiedener Stämme von *Streptococcus faecalis*.

1) *S. faecalis* var. *faecalis*, 7064; 2) *S. faecalis* var. *zymogenes*, 20672; 3) *S. faecalis* var. *liquefaciens*, 7415; 4) *S. faecium*, ATCC 9790; 5) *S. faecalis*, NCIB 81912 (79).

FETTSÄUREN	1	2	3	4	5
14:0	5,2	3,6	5,5	4,9	3,7
14:1	-	-	1,2	-	-
16:0	25,7	25,2	23,2	33,2	40,0
16:1	12,0	11,0	11,5	5,6	8,1
18:0	2,8	3,2	1,7	2,8	-
18:1	38,7	34,9	41,3	35,3	34,5
19cy	15,6	22,1	15,5	18,2	13,8

tumsphase, Temperatur und Zusammensetzung des Mediums (78) den Anteil der verschiedenen Fettsäuren verändern. Systematische Untersuchungen in dieser Richtung wurden nicht durchgeführt.

Aus *Streptococcus faecalis* var. *faecalis* wurden zur Analyse der Einzellipide Diglucosyldiglycerid, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin, sowie die Phosphoglucolipide III, V und VI isoliert. Auf die Isolierung von Monoglucosyldiglycerid und Phosphoglucolipid I wurde wegen zu geringer Mengen verzichtet. Lysylphosphatidylglycerin war unter den gegebenen Wachstumsbedingungen, bei denen das pH durch automatische Neutralisation bei 7 gehalten wurde, nicht gebildet worden (vgl. 31).

Die Fettsäurezusammensetzung der analysierten Glyko- und Phospholipide war in *S. faecalis* äußerst ähnlich (Tabelle 22, Spalte 2 - 4); die Phospholipide wiesen lediglich einen etwas höheren Anteil an Tetradecan-

Tab. 22: Fettsäurezusammensetzung der Lipide aus *Streptococcus faecalis* var. *faecalis*.

FETTSÄUREN	P H O S P H O G L U C O L I P I D E									
	DGDG	PG	DPG	III	DGDG- Anteil rest	Phospha- tidyl- rest	VI	DGDG- Anteil rest	Phospha- tidyl- rest	V
14:0	5,7	8,7	8,9	5,9	6,0	6,7	5,7	3,2	5,1	4,2
14:1	n.a.	0,9	0,6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
16:0	30,0	31,8	29,2	30,7	30,2	31,0	28,4	29,7	31,6	27,0
16:1	11,4	11,4	11,2	11,4	10,7	10,9	10,4	10,8	8,2	12,9
18:0	2,8	1,8	1,9	2,6	2,3	2,3	1,7	2,9	2,1	2,1
18:1	28,8	16,5	24,9	30,8	34,8	28,3	39,7	46,5	33,6	46,3
19 _{Cy}	21,0	28,8	23,2	18,5	15,5	20,9	14,0	6,7	19,3	7,7
C _{18:1} + C _{19:cy}	49,8	45,3	48,1	49,3	50,3	49,2	53,7	53,2	52,9	54,0

und einen niedrigeren Anteil an Octadecansäure auf. Größere Unterschiede fanden sich im Gehalt an Octadecen- und C_{19} -Cyclopropansäure, deren Summen jedoch weitgehend konstant sind. Da die Cyclopropansäuren nach bisheriger Kenntnis (3, 80) am fertig synthetisierten Lipid aus den entsprechenden Monoensäuren gebildet werden, könnten die sich komplementierenden Unterschiede im Gehalt an Octadecen- und C_{19} -Cyclopropansäure durch unterschiedliche Affinität der einzelnen Lipide zur Cyclopropansynthetase verursacht sein. Das ursprüngliche, vor der Modifikation durch die Cyclopropansäuresynthetase vorhandene Fettsäuremuster wäre dann für Phospho- und Glykolipide noch ähnlicher.

Da sich die Diglucosyldiglyceridanteile der Phosphoglucolipide III, V und VI zumindest formal aus dem in der Streptococcenmembran vorhandenen Diglucosyldiglycerid herleiten (Schema 20, Seite 120), war ihre Fettsäurezusammensetzung von besonderem Interesse. Wie Tabelle 22 zeigt, ist das gefundene Muster mit dem von Diglucosyldiglycerid weitgehend identisch, wenn man wiederum vom unterschiedlichen Gehalt an Octadecen- und C_{19} -Cyclopropansäure absieht. Letztere ist im Diglucosyldiglyceridanteil von Phosphoglucolipid III deutlich vermindert (15,5 gegenüber 21,0 %) und erreicht im Diglucosyldiglyceridanteil von Phosphoglucolipid V und VI die niedrigsten Werte (7,7 und 6,7 %). Die Summen von Octadecen- und C_{19} -Cyclopropansäure liegen jedoch mit 50,3 %, 54 % und 53,2 % wiederum nahe dem für Diglucosyldiglycerid gefundenen Wert von 49,8 %. Diese Übereinstimmung zusammen mit dem sonst fast identischen Fettsäuremuster läßt auf weitgehende Ähnlichkeit der Ausgangsmoleküle untereinander und mit dem Membran-Diglucosyldiglycerid schließen.

Eine vergleichbare Ähnlichkeit zeigen schließlich die Fettsäuremuster der Phosphatidylreste von Phosphoglucolipid III und VI mit dem der Phosphatidylreste in Phosphatidyl- und Diphosphatidylglycerin. Es findet sich jedoch ein erniedrigter Cyclopropanisierungsgrad im Phosphatidylanteil der Phosphoglucolipide. Außerdem wird hier der bei einfachen Phospholipiden erhöhte Gehalt an Tetradecansäure vermißt.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß den Phosphatidyl- und Diglyceridanteilen in Phospho-, Glyko- und Phosphoglykolipiden ein einheitliches Fettsäuremuster zugrunde liegt, das geringfügig durch Änderungen im Gehalt an Tetradecansäure, stärker durch die sich komplementierenden Unterschiede an Octadecen- und C₁₉-Cyclopropanensäure modifiziert ist.

Für alle Lipide aus *S. faecalis* var. *faecalis* wurde die Verteilung der Fettsäuren auf die beiden Positionen der jeweiligen Glycerinanteile nach den in den Abschnitten (Seite 57 bis Seite 84) beschriebenen Methoden ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefaßt und der Übersichtlichkeit wegen in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Zunächst fällt auf, daß sich die gleiche Ähnlichkeit wie in der Fettsäurezusammensetzung auch in der Verteilung der Fettsäuren auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Phospho- und Glykolipiden, sowie in den entsprechenden Anteilen der Phosphoglucolipide zeigt. In allen Lipiden findet man ein ausgesprochen prägnantes Fettsäureverteilungsmuster, das im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen (82, 83) nicht nach gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, sondern nach Kettenlänge der Fettsäuren selektioniert; so finden sich Tetradecan-, Hexadecan- und Hexadecensäure nahezu ausschließlich in Position 2, während Octadecan-, Octadecen- und C₁₉-Cyclopropanensäure vorwiegend in Position 1 verestert

Tab.23: Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Gluco-, Phospho- und Phosphoglucolipiden aus *S.faecalis* var. *faecalis*.

FETT-SÄUREN	Diglucosyldiglyceridanteil aus Phosphoglucolipid							
	DGDG		III		VI		V	
	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2
14:0	1,7	9,7	1,4	10,6	0,6	5,8	3,1	5,3
16:0	5,4	54,6	4,5	55,9	4,4	55,0	6,4	47,6
16:1	5,6	17,2	5,8	15,6	3,6	18,0	5,0	20,8
18:0	4,9	0,7	3,4	1,2	4,1	1,7	1,9	2,3
18:1	39,9	17,7	53,4	16,2	73,5	19,5	70,7	21,9
19 _{cy}	42,0	-	31,0	-	13,4	-	13,9	1,9
Verteilungsprozent								
C ¹⁴ -C ¹⁶	13,5	86,5	12,5	87,5	9,8	90,2	16,4	83,6
C ¹⁴ -C ¹⁸	82,4	17,5	83,4	16,6	81,1	18,9	77,1	22,9
FETT-SÄUREN	Phosphatidylanteil aus Phosphoglucolipid							
	PG		DPG		III		VI	
	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2
14:0	0,4	17,1	1,9	16,5	2,0	11,4	-	11,4
14:1	-	1,8	-	1,4	-	-	-	-
16:0	6,5	53,9	7,2	50,3	8,1	53,9	7,4	46,1
16:1	3,7	18,6	4,2	17,0	3,2	18,6	2,2	19,0
18:0	3,4	0,3	3,6	0,5	3,3	1,3	2,9	2,2
18:1	25,7	8,2	35,8	14,9	41,6	15,0	49,0	18,5
19 _{cy}	60,3	-	47,4	-	41,8	-	38,4	2,7
Verteilungsprozent								
C ¹⁴ -C ¹⁶	10,4	89,6	13,5	86,5	13,7	86,3	11,1	88,9
C ¹⁴ -C ¹⁸	91,3	8,7	84,9	15,1	84,1	15,9	79,4	20,6

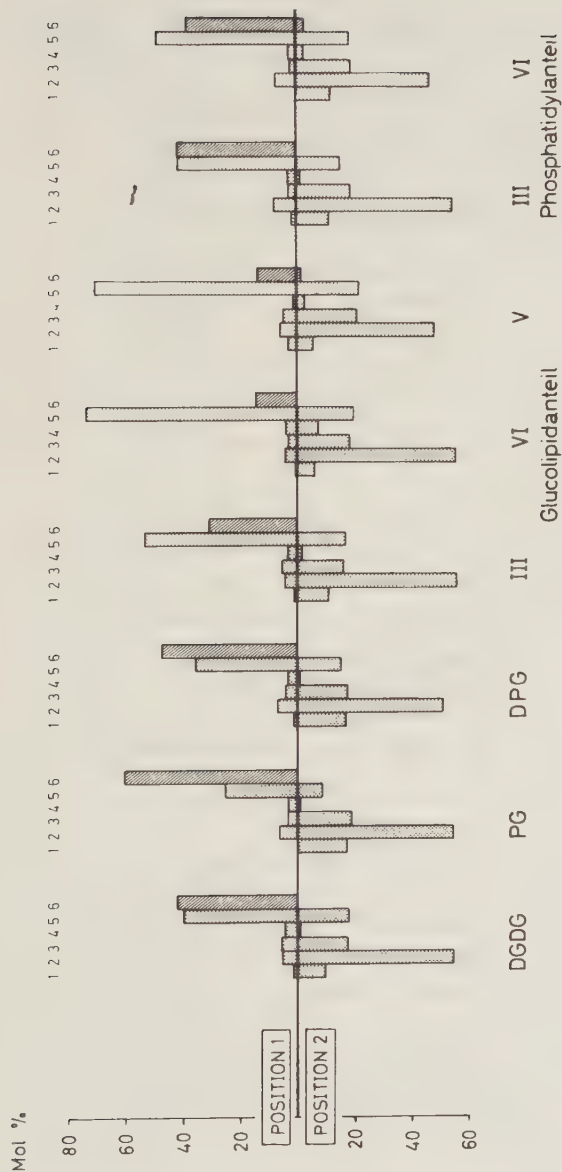


Abb. 13: Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Gluco-, Phospho- und Phosphoglucolipiden aus *Streptococcus faecalis* var. *faecalis*. Fettsäuren: 1, C₁₄; 2, C₁₆; 3, C₁₆; 4, C₁₈; 5, C₁₈; 6, C₁₉cy.

Tab. 24: Prozentuale Anteile der hauptsächlichsten Molekülspezies der Lipide aus *S. faecalis* var. *faecalis*. Die Berechnung erfolgte aus den Werten in Tabelle 23. Aufgeführt sind die Hauptanteile der Spezies mit Octadecen- und C_{19} -Cyclopropansäure in Position 1 der Glycerinanteile; Anteile anderer Kombinationen maximal 4%. Speziestypen: GG, gesättigt-gesättigt; UG, ungesättigt-gesättigt; GU, gesättigt-ungesättigt; UU, ungesättigt-ungesättigt. C_{19} -Cyclopropansäure wurde den ungesättigten Fettsäuren zugeordnet (81). Zur Berechnung der Typen wurden sämtliche Spezies herangezogen.

Kombination	Glucolipid- anteil						Phosphatidyl- anteil	
	DGDG	PG	DPG	III	V	VI	III	VI
18:1/14:0	4	4	6	6	4	4	5	6
18:1/16:0	22	14	18	30	34	40	22	23
18:1/16:1	7	5	6	8	15	13	8	9
18:1/18:1	7	2	5	9	15	14	6	9
19cy/14:0	4	10	8	3	1	1	5	4
19cy/16:0	23	33	24	17	7	7	23	18
19cy/16:1	7	11	8	5	3	3	8	7
19cy/18:1	7	5	7	5	3	3	6	7
Speziestypen								
GG	8	7	9	6	6	6	9	6
UG, GU	61	67	63	64	55	60	62	57
UU	31	26	29	29	40	34	29	36

sind (vgl. Tabelle 23). Die Spezifität in Position 1 ist etwas höher, da sich hier nur 10 - 18 % der kurzkettigen Fettsäuren finden, während in Position 2 bis zu 23 % Octadecensäure lokalisiert sein kann. Eine besonders hohe Positionsspezifität weist C_{19} -Cyclopropansäure auf, da sie ausschließlich in Position 1 gefunden wird. Da Octadecensäure, die Biosynthesestufe von C_{19} -Cyclopropansäure, auch in Position 2 vorkommt, vermuten wir eine ausgesprochene Positionsspezifität der Cyclopropan-synthetase in *S. faecalis*. Damit stünde auch das Fehlen

von C₁₇-Cyclopropansäure in Einklang, da Hexadecensäure, die entsprechende Vorstufe, auf Position 2 beschränkt ist.

Aufgrund der Verteilungsspezifität der Fettsäuren sind für die einzelnen Lipide nur eine relativ begrenzte Anzahl von Molekülspezies möglich. Unter Annahme zufallsbedingter Kombinationsmöglichkeit¹⁾ wurden diese für die verschiedenen Lipide berechnet und in Tabelle 24 zusammengestellt. Bei allen Lipiden bestehen etwa 40 % aller Spezies aus den Kombinationen 18:1/16:0 und 19cy/16:0; ihr Verhältnis variiert entsprechend dem Cyclopropanisierungsgrad. Bei weiteren 40 % ist Octadecen- oder C₁₉-Cyclopropansäure mit Tetradecan-, Hexadecen- oder Octadecensäure kombiniert.

Rechnet man die Cyclopropansäure wie allgemein üblich (31, 81) zu den ungesättigten Fettsäuren, erhält man die im unteren Teil von Tabelle 24 wiedergegebenen Speziestypen: Die Kombination von zwei gesättigten Fettsäuren ist relativ selten (6 - 9 %); am häufigsten ist eine gesättigte und ungesättigte Fettsäure kombiniert (55 - 67 %); weniger häufig sind Spezies mit zwei ungesättigten Fettsäuren (26 - 40 %).

¹⁾An einigen Pflanzenlipiden wurde kürzlich gezeigt, daß der gefundene Anteil bestimmter Spezies von dem berechneten abweichen kann (84).

Tab. 25: Fettsäurezusammensetzung und Positionsverteilung in Phosphoglucolipid III und V aus *Streptococcus faecalis* var. zymogenes.

FETT- SÄUREN	DGDG- Anteil		Phospha- tidyl- rest	
	III	III	III	V
14:0	5,5	5,0	5,4	1,8
14:1	0,4	0,5	0,6	-
16:0	29,8	30,6	29,1	24,2
16:1	8,6	8,7	7,9	10,3
18:0	3,7	3,8	2,9	2,6
18:1	35,6	38,5	34,8	50,5
19cy	16,1	12,9	19,3	10,5
C _{18:1} C _{19cy}	51,7	51,4	54,1	61,0

FETT- SÄUREN	DGDG-Anteil		Phosphatidylrest			
	III		V		III	
	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2
14:0	3,3	6,7	-	3,7	1,5	8,9
14:1	-	0,5	-	-	-	1,4
16:0	5,7	55,6	8,6	39,8	10,2	46,7
16:1	4,0	13,4	-	20,6	-	15,5
18:0	6,4	1,2	4,4	0,8	4,5	1,3
18:1	54,4	22,6	65,8	35,2	44,2	26,2
19cy	25,8	-	21,0	-	39,6	-

Verteilungsprozent						
C ₁₄ -C ₁₆	14,6	85,4	11,8	88,2	13,9	86,1
C ₁₈ -C ₁₉	78,4	21,6	71,2	28,8	76,4	23,6

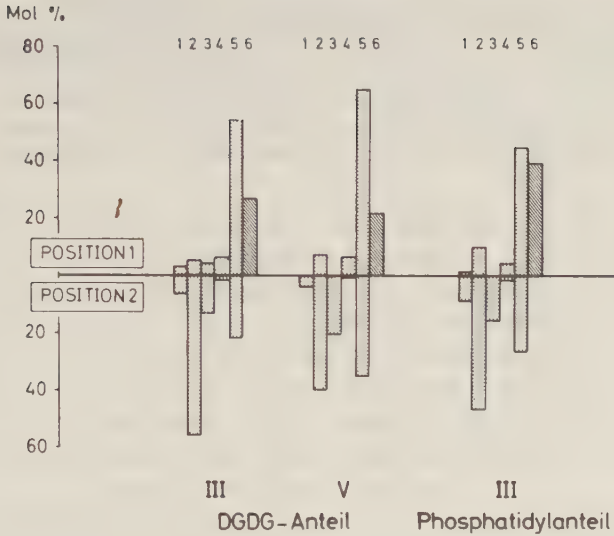


Abb. 14: Fettsäureverteilung in den Lipiden aus *S. faecalis* var. *zymogenes*. Fettsäuren: 1, C₁₄; 2, C₁₆; 3, C_{16:1}; 4, C₁₈; 5, C_{18:1}; 6, C_{19cy}.

Von *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* wurden nur Phosphoglucolipid III und V isoliert und hinsichtlich Zusammensetzung und Verteilung der Fettsäuren analysiert. Die in Tabelle 25 wiedergegebene Fettsäurezusammensetzung zeigte ähnliche Mengenverhältnisse für die einzelnen Fettsäuren wie in *S. faecalis* var. *faecalis* (vgl. Tabelle 22). Die Verwandtschaft der beiden Stämme zeigt sich auch in der Identität des Verteilungsprinzips der Fettsäuren (Abbildung 14). Überdies ist die Cyclopropansynthetase wie in *S. faecalis* var. *faecalis* für Position 1 spezifisch. Arten und Anteile der Molekülspezies sind ähnlich wie bei *S. faecalis* var. *faecalis*.

Tab. 26: Fettsäurezusammensetzung der Lipidextrakte verschiedener Stämme von Streptococcus lactis. 1) S.lactis, Laborstamm; 2) S.lactis, 20512; 3) S.lactis, NCDO 712; 4) S.lactis (l.c.85); 5) S.lactis var. miltigenes (85) 6) S.cremoris, ATCC 9625 (85). Für die Differenz auf 100 %, welche die Summen der Fettsäureanteile in den Lipidextrakten der letzten drei Stämme ergeben, werden von den Autoren verzweigtkettige Fettsäuren angegeben (85).

FETTSÄUREN	1	2	3	4	5	6
14:0	11,5	9,5	8,3	9,1	16,6	15,0
16:0	21,0	16,1	22,0	33,4	34,5	27,5
16:1	18,2	7,0	2,0	3,1	2,7	2,3
18:0	-	-	0,8	-	0,7	0,4
18:1	49,2	59,4	39,5	19,6	16,8	4,8
19cy	-	7,9	27,4	19,9	19,3	44,7

V.2 Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren in den polaren Lipiden von Streptococcus lactis.

Für die Isolierung der polaren Lipide wurde ein Laboratoriumsstamm von Streptococcus lactis (Serogruppe N) verwendet. Das Fettsäuremuster, erhalten durch Desacylierung des nicht fraktionierten Rohextraktes, ist in Spalte 1, Tabelle 26 gegeben. Gegenüber den Stämmen von S.faecalis findet sich mehr Tetradecansäure, während C₁₉-Cyclopropansäure fehlt. Verglichen mit Angaben der Literatur (Tabelle 26, Spalte 4 - 6) ist das Fehlen von C₁₉-Cyclopropansäure für Stämme der Serogruppe N atypisch. Wir prüften deshalb das Gesamtfettsäuremuster von zwei weiteren Stämmen (Tabelle 26, Spalte 2 und 3), wobei C₁₉-Cyclopropansäure, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, gefunden wurde. Der von uns verwendete Stamm verlor offensichtlich durch Mutation die Cyclopropansynthetase, was auch für S.faecalis (86) und E.coli (80) beschrieben ist.

Tab. 27: Fettsäurezusammensetzung der Lipide aus Streptococcus lactis.

FETT- SÄUREN	PHOSPHOGLUCOLIPID							
	MGDG	DGDG	PG	Lysyl- PG	DPG	III	Phospha- DGDG- tidyl- Anteil rest	
14:0	7,0	6,7	15,2	11,7	13,3	9,5	6,9	12,3
14:1	0,4	-	2,2	2,6	1,7	1,2	-	1,3
16:0	25,3	30,1	19,8	18,9	20,9	22,4	27,7	22,2
16:1	17,5	14,0	19,1	19,3	15,0	17,7	17,5	18,2
18:1	49,9	49,2	43,7	47,5	49,0	49,0	47,9	46,1

Insgesamt sind die Fettsäuremuster der in Tabelle 26 aufgeführten Stämme von *S. lactis* weniger einheitlich als bei *S. faecalis*. Ähnlich uneinheitlich ist bei Stämmen der Serogruppe N auch die Zusammensetzung der polaren Lipide (22): Stamm 3 bildet im Gegensatz zu Stamm 1 kein Phosphoglucolipid III, statt dessen aber eine Reihe stärker polarer Phosphoglykolipide, deren Struktur derzeit noch nicht untersucht ist.

Für die Analyse der Fettsäuremuster der Einzellipide wurden aus Stamm 1 Monoglucosyldiglycerid, Diglucosyldiglycerid, Phosphatidyl- und Diphosphatidylglycerin, sowie Lysylphosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid III isoliert (17, 51, 52); verzichtet wurde lediglich auf die Reinigung des nur in geringer Menge vorhandenen Phosphoglucolipids V. Lysylphosphatidylglycerin war hier reichlich vorhanden, da der Stamm ohne Neutralisation der laufend anfallenden Milchsäure gezüchtet wurde, wodurch der pH-Wert des Mediums während des Wachstums von 7,5 auf 4,8 gefallen war.

In Tabelle 27 ist die Fettsäurezusammensetzung der Einzellipide zusammengestellt. Sie ist innerhalb der Glyko- und der Phospholipide einheitlich, zwischen beiden

Gruppen bestehen aber größere Unterschiede als bei *S. faecalis*. Die dort angedeutete Anreicherung von Tetradecansäure in den Phospholipiden ist hier ausgeprägter: Ihr Anteil ist in den Phospholipiden nahezu doppelt so hoch wie in den Glucolipiden, was durch eine entsprechende Verminderung der Hexadecansäure kompensiert ist. Die Tendenz zum vermehrten Einbau kurzkettiger Fettsäuren in die Phospholipide ist allgemeiner Natur, da auch vermehrt Tetradecensäure gefunden wird, die in den Glykolipiden unter der gaschromatographischen Auswertbarkeitsgrenze bleibt. In Phosphoglucolipid III zeigen Diglucosyldiglycerid- und Phosphatidylanteil jeweils das für die Glyko- und Phospholipide charakteristische Fettsäuremuster.

Die Ergebnisse der an den vorgenannten Lipiden durchgeführten Verteilungsanalysen der Fettsäuren sind in Tabelle 28 und Abbildung 15 zusammengefaßt. Phospho- und Glucolipide, sowie die entsprechenden Anteile in Phosphoglucolipid III zeigen ein einheitliches Verteilungsprinzip, das wie bei *S. faecalis* nach der Länge der Fettsäureketten selektioniert: Wie dort ist Position 2 vorwiegend durch die C_{14} - und C_{16} -Fettsäuren besetzt, während in Position 1 hauptsächlich Octadecensäure gefunden wird. In den Phospholipiden ist in Position 2 ein beträchtlicher Teil der Hexadecansäure durch Tetradecansäure ersetzt.

Durch das Fehlen von C_{19} -Cyclopropansäure bei gleich hoher Positionsspezifität ist die Zahl der möglichen Molekülspezies gegenüber *S. faecalis* auf die Hälfte reduziert (Tabelle 29). Bei den Glucolipiden und dem Diglucosyldiglyceridanteil von Phosphoglucolipid III bestehen 40 - 50 % der Molekülspezies aus der Kombination 18:1/16:0, weitere 40 % aus 18:1/14:0, 18:1/16:1 und 18:1/18:1. Bei den Phospholipiden und ent-

Tab. 28: Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Gluco- und Phospholipiden sowie im Phosphoglucolipid III aus *S.lactis*.

FETT- SÄUREN	MGDG		DGDG		PG		Lysyl-PG		DPG		DGDG- Anteil		PHOSPHOGLUCOLIPID III Phospha- tidylrest	
	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2
14:0	2,4	11,6	4,4	9,0	-	28,6	-	24,2	0,8	27,9	3,4	10,4	1,1	23,5
14:1	-	0,4	-	-	-	6,2	-	4,0	-	2,9	-	0,6	-	2,8
16:0	-	52,3	-	60,7	5,9	32,7	5,8	32,5	6,0	34,1	4,6	50,9	8,7	35,7
16:1	9,7	25,2	10,1	17,8	10,8	24,2	10,7	26,0	13,9	22,8	10,4	24,5	13,3	23,1
18:0	-	-	-	-	1,6	-	1,9	--	1,3	0,7	-	-	-	-
18:1	88,9	10,9	86,0	12,4	81,7	8,3	81,7	13,3	77,9	11,8	82,2	13,6	77,4	14,8
Verteilungsprozent														
C ₁₄ - C ₁₆	11,9	88,1	14,2	85,8	15,4	84,6	16,0	84,0	19,1	80,9	17,6	82,4	21,2	78,9
C ₁₈	89,1	10,9	87,4	12,6	90,9	9,1	86,3	13,7	86,4	13,6	85,8	14,2	83,9	16,1

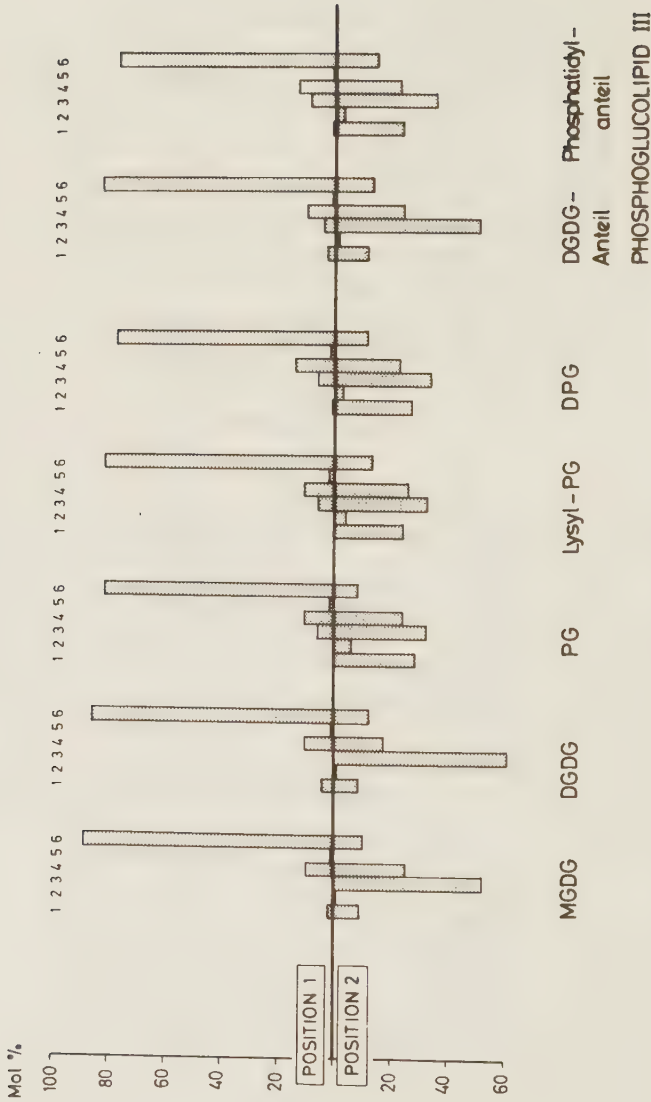


Abb. 15: Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Gluco-, und Phospholipiden sowie im Phosphogluclolipid III aus Streptococcus lactis. Fettsäuren: 1, C₁₄:2, C₁₄:1'; 3, C₁₆:4, C₁₆:1'; 5, C₁₈:6, C₁₈:1'.

Tab. 29: Prozentuale Anteile der hauptsächlichlichen Molekülspezies sowie der Speziestypen der Lipide aus S.lactis.
 Zur Berechnung dienten die Werte aus Tabelle 28. Anteile anderer Kombinationen maximal bei 6 %. Speziestypen, wie in Legende zu Tabelle 24 beschrieben.

KOMBINATION				Lysyl-		PHOSPHOGLUCOLIPID III		III
	MGDG	DGDG	PG	PG	DPG	Anteil	rest	
18:1/14:0	10	8	23	20	22	9	18	
18:1/14:1	-	-	5	2	2	-	-	
18:1/16:0	47	52	27	27	27	42	28	
18:1/16:1	22	15	20	21	18	20	18	
18:1/18:1	10	11	7	11	9	11	11	

Speziestypen							
GG	2	3	5	4	5	5	6
GU, UG	64	69	60	56	61	60	58
UU	36	29	36	40	34	36	37

sprechend auch im Phosphatidylanteil von Phosphogluco-
 lipid III ist durch den höheren Gehalt an C₁₄-Fettsäuren die Hauptspezies 18:1/16:0 um mehr als ein Drittel reduziert und durch entsprechende Anteile der Kombinationen 18:1/14:0 und 18:1/14:1 ersetzt, deren Summe 18 - 28 % erreicht und damit fast doppelt so hoch liegt wie in den Phosphatidylresten von S.faecalis. Die Speziestypen sind ähnlich wie dort verteilt: 56 - 69 % bestehen aus der Kombination einer gesättigten mit einer ungesättigten Fettsäure.

V.3 Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren in den polaren Lipiden aus Streptococcus haemolyticus D-58

Tabelle 30 gibt die Fettsäurezusammensetzung von Lipidrohextrakten aus S.haemolyticus D-58 (Serogruppe A),

Tab. 30: Fettsäurezusammensetzung der Lipidextrakte von *Streptococcus haemolyticus*. a) Werte aus der Literatur (15); Extrakt b) und c) wurden von uns analysiert.

FETTSÄUREN	a	b	c
12:0	3,0	3,6	2,0
14:0	5,0	8,6	7,7
16:0	37,0	42,3	37,7
16:1	28,0	18,8	21,8
18:0	3,0	2,8	2,6
18:1	24,0	23,7	27,5

drei verschiedenen, aber unter denselben Bedingungen durchgeführten Züchtungen aus den Jahren 1967 (a), 1970 (b) und 1972 (c). Trotz Schwankungen im Anteil einzelner Fettsäuren ist das Gesamtbild konstant: Hexadecansäure stellt den Hauptanteil, gefolgt von Hexadecen- und Octadecensäure, während Tetradecan-, Dodecan- und Octadecensäure einen geringen Anteil ausmachen. Cyclopropansäuren sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen an anderen Stämmen der Serogruppe A (5, 87) nicht nachweisbar. Fettsäuren mit ungerader C-Atomzahl, verzweigtkettige und Hydroxyfettsäuren fehlen auch hier (vgl. Seite 85).

S. haemolyticus war für vergleichende Fettsäureanalysen besonders geeignet, da dieser Stamm eine besondere Vielfalt an polaren Lipiden, insbesondere auch an Phosphoglucolipiden synthetisiert (Abbildung 5). Es wurden alle Lipide isoliert und auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. Mit Ausnahme von Phosphoglucolipid IV, das nur in sehr geringer Menge gewonnen werden konnte (vgl. Seite 43), wurden für alle Lipide Fettsäureverteilungsanalysen durchgeführt.

In Tabelle 31 ist die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Lipide gegeben. Erwartungsgemäß findet man dieselben Fettsäuren wie im Gesamtextrakt (Tabelle 30, c). Für den Vergleich der Fettsäurezusammensetzung bleiben Acylphosphatidylglycerin sowie die Phosphoglucolipide I - IV zunächst außer Betracht, da sie zwei acylierte Glycerinanteile enthalten.

Bei den einfachen Glyko- und Phospholipiden wird die bei *S.faecalis* gefundene Einheitlichkeit vermißt. Die Glykolipide unterscheiden sich von den Phospholipiden durch das Fehlen von Dodecansäure und einem niedrigeren Gehalt an Tetradecansäure, was durch vermehrten Einbau an Hexadecan- und Octadecansäure kompensiert ist. Aber auch die Glykolipidreihe in sich ist nicht einheitlich. Eine gute Übereinstimmung zeigt die Fettsäurezusammensetzung der Monohexosylderivate (MGDG, NacglcDG) sowie auch die durch Di- und Tri-glucosyldiglycerid vertretene Reihe der höheren Homologen. Beide Reihen unterscheiden sich jedoch dadurch, daß bei den höheren Homologen der Anteil der kurzkettigen Fettsäuren (14:0, 16:0, 16:0) zugunsten von Octadecensäure vermindert ist. Diesem Muster gliedert sich die Fettsäurezusammensetzung von Lipid V an, wie es für das Glycerinphosphatderivat von Diglucosyldiglycerid zu erwarten war.

Noch größer sind die Unterschiede innerhalb der Phospholipidreihe, wenn man Phosphatidyl- und Diphosphatidylglycerin (Tabelle 31) sowie den Phosphatidylrest aus Acylphosphatidylglycerin (Tabelle 33) vergleicht. Das Muster von Phosphatidylglycerin nimmt etwa eine Mittelstellung zwischen Glykolipiden und Diphosphatidylglycerin ein. Der Phosphatidylanteil in Acylphosphatidylglycerin zeigt einen ähnlich hohen Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren (12:0, 14:0) wie Diphosphatidylglycerin, unterscheidet sich aber von diesem durch umgekehrte Mengenverhältnisse an Hexadecan- und Hexadecensäure (vgl. Tabelle 31 und 33).

Tab. 31: Fettsäurezusammensetzung der Lipide aus *Streptococcus haemolyticus*. Die Fettsäurezusammensetzung von Acylphosphatidylglycerin ist in Tabelle 34 aufgeführt.

FETT-SÄUREN	Nacglic-					
	MGDG	DG	DGDG	TGDG	PG	DPG
12:0	-	-	-	-	-	4,2
14:0	2,4	2,9	1,7	1,4	7,7	12,1
16:0	41,9	41,2	36,4	35,2	40,2	36,5
16:1	24,1	21,9	19,5	18,7	20,7	25,1
18:0	1,7	1,7	2,3	2,8	3,3	2,3
18:1	30,4	32,2	40,1	41,9	28,1	19,8

FETT-SÄUREN	P H O S P H O G L U C O L I P I D E				
	I	II	III	IV	V
12:0	1,6	2,4	2,6	3,3	-
14:0	7,1	7,9	8,1	6,9	1,4
16:0	35,8	36,9	37,6	33,0	39,5
16:1	28,1	26,5	26,3	31,2	14,9
18:0	1,3	1,0	1,2	1,2	3,4
18:1	26,1	25,4	24,2	24,7	40,8

FETT-SÄUREN	Glucolipid- anteil von			Phosphatidyl- anteil von		
	I	II	III	I	II	III
12:0	-	-	-	4,8	5,0	5,9
14:0	2,6	2,4	2,3	12,8	14,2	14,2
16:0	40,6	41,1	42,3	31,2	32,8	33,7
16:1	23,8	21,3	21,4	33,1	32,5	30,4
18:0	1,8	1,7	1,8	1,4	1,0	1,0
18:1	31,2	33,5	32,2	16,7	14,5	14,9

Die Phosphoglucolipide I - IV, die aus einem Phosphatidyl- und Glykolipidanteil bestehen (Seite 2) zeigen eine relativ einheitliche Fettsäurezusammensetzung, die eine Mittelstellung zwischen der der einfachen Glykolipide und des Diphosphatidylglycerins einnimmt (Tabelle 31). Von besonderem Interesse war hier die getrennte Analyse der beiden Molekülbestandteile, deren Ergebnisse für Lipid I - III in Tabelle 31 gegeben sind. Das Fettsäuremuster der Glykolipidanteile zeigen untereinander und mit den Monohexosyldiglyceriden weitgehende Übereinstimmung. Obwohl Phosphoglucolipid II und III Derivate des Diglucosyldiglycerids sind, unterscheiden sie sich von diesem durch höhere Anteile an C_{16} -Fettsäuren und eine entsprechende Verringerung an Octadecensäure. Die Fettsäurezusammensetzung der Phosphatidylanteile dieser drei Verbindungen ist untereinander wieder identisch und weist Ähnlichkeit mit der von Diphosphatidylglycerin auf, wenn auch Hexadecan- und Octadecensäure etwas zugunsten von Hexadecensäure vermindert sind.

Die in Tabelle 31 und zusammengestellten Verbindungen wurden hinsichtlich der Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen ihrer Glycerinanteile analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 zusammengefaßt und in Abbildung 16 graphisch dargestellt. Verglichen mit den Lipiden der vorausgehend beschriebenen Stämme von *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus lactis* fallen hier zwei Besonderheiten auf: Die dort gefundene Verteilungsspezifität der einzelnen Fettsäuren ist weitgehend aufgehoben. Phospho- und Glucolipide unterscheiden sich entsprechend ihrer unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung auch deutlich in dem in Abbildung 16 gegebenen Verteilungsdiagramm.

Bei den einfachen Glucolipiden findet sich Tetradeconsäure in Position 2, Hexadecansäure ist fast

Tab. 32: Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Phospho-, Gluco- und Phosphoglucolipiden aus *S. haemolyticus*. Die Fettsäureverteilung in Acylphosphatidylglycerin ist in Tabelle 34 gesondert aufgeführt.

FETT- SÄUREN	PG		DPG		MGDG		Nacglc-DG		DGDG		TGDG	
	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2
12:0	-	1,8	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-
14:0	-	14,7	2,2	26,3	1,7	3,1	1,8	4,1	-	3,4	-	-
16:0	36,7	40,7	44,7	30,3	42,4	41,4	38,8	43,6	42,2	30,6	42,1	28,3
16:1	13,1	21,2	28,5	21,9	33,2	15,0	31,3	12,5	30,5	8,5	27,3	10,1
18:0	9,6	2,0	3,2	0,8	2,1	1,3	2,3	1,1	1,9	2,7	2,8	2,8
18:1	40,9	19,3	21,4	10,6	22,7	38,4	25,7	38,7	25,3	54,9	24,9	58,9

PHOSPHOGLUCOLIPIDE											
Phosphatidylanteile				Glucolipidanteile							
I		II		III		I		II		III	
Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2
12:0	-	13,1	-	14,7	11,2	-	2,2	-	-	-	-
14:0	2,1	24,5	2,0	26,4	2,7	24,1	0,4	1,2	3,6	2,1	1,6
16:0	37,0	28,0	35,8	25,1	41,6	25,9	40,8	44,2	38,0	40,6	41,7
16:1	38,6	23,5	41,4	24,5	33,9	28,1	30,2	25,8	17,0	28,3	19,4
18:0	1,8	0,9	1,6	0,5	2,1	0,8	2,3	1,7	1,7	2,1	5,1
18:1	20,6	10,1	19,1	8,7	19,8	9,9	28,6	27,3	39,7	26,9	31,8

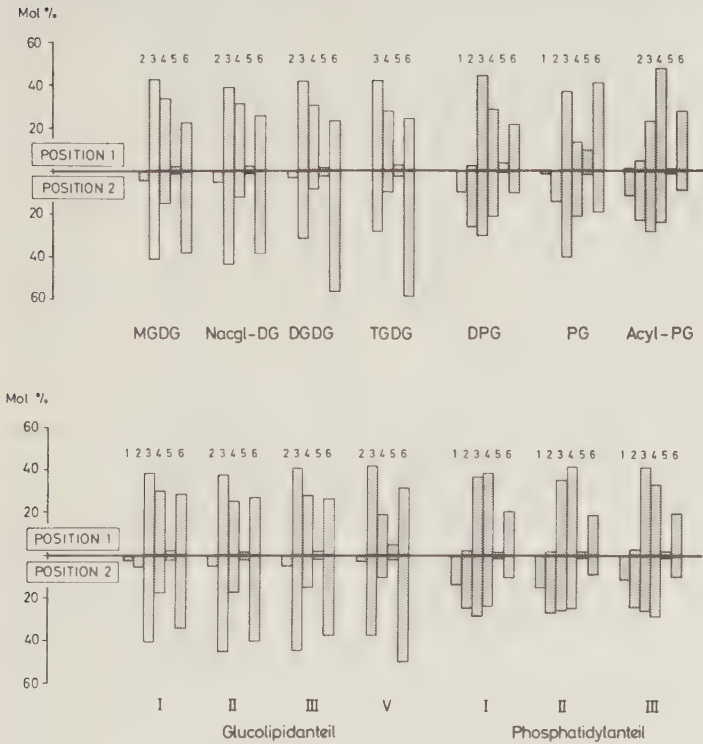


Abb. 16: Fettsäureverteilung auf die beiden Positionen der Glycerinanteile in Gluco-, Phospho- und Phosphoglu-
colipiden aus *Streptococcus haemolyticus*. Fettsäuren:
1, C₁₂; 2, C₁₄; 3, C₁₆; 4, C_{16:1}; 5, C₁₈; 6, C_{18:1}.

häftig auf beide Positionen verteilt, während Hexadecensäure etwas mehr in Position 1 als in Position 2 und Octadecensäure etwas mehr in Position 2 als in Position 1 eingebaut ist. Deutlicher wird der bevorzugte Einbau von Octadecensäure in Position 2 bei Di- und Triglucoxydiglycerid sowie bei dem aus DGDG abgeleiteten Phosphoglucolipid V. Das gleiche Verteilungsprinzip wie die einfachen Glucolipide weisen auch die Glykolipidanteile der Phosphoglucolipide I - III auf. Daß der Diglucoxydiglyceridanteil von Phosphoglucolipid II und III den Monohexoxydiglyceriden ähnlicher ist als dem Diglucoxydiglycerid, wird auch im Verteilungsdiagramm deutlich.

Bei den Phospholipiden, die sich durch Vorhandensein von Dodecensäure und einen höheren Gehalt an Tetradecensäure auszeichnen, finden sich diese beiden kurzkettigen Säuren spezifisch in Position 2; Hexadecan- und Hexadecensäure sind auf beide Positionen verteilt, während Octadecensäure im Gegensatz zu den Glykolipiden mehr in Position 1 lokalisiert ist. Diphosphatidylglycerin, Phosphatidylglycerin und der diesem entsprechende Diglyceridanteil aus Acylphosphatidylglycerin zeigen im Verteilungsdiagramm größere Unterschiede als die Vertreter der Glykolipidreihe.

Phosphatidylglycerin fällt völlig aus dem Rahmen, während die beiden anderen Verbindungen bis auf die unterschiedlichen Anteile von Hexadecan- und Hexadecensäure in Position 1 einander weitgehend entsprechen.

Einen auffallend einheitlichen Typ stellen die Phosphatidylreste der Phosphoglucolipide I - III dar, deren Verteilungsmuster im wesentlichen dem der Phosphatidylreste von Diphosphatidyl- und Acylphosphatidylglycerin entspricht, wobei die Anteile der Hexadecensäure und Hexadecensäure in Position 1 eine Mittel-

Tab. 33: Fettsäurezusammensetzung sowie Fettsäureverteilung auf die drei Positionen der Glycerinanteile in Acylphosphatidylglycerin aus *S. haemolyticus*. MG, Monoglycerid (entspricht dem acylierten sn-Glycerin-1-Phosphatanteil).

FETT-SÄUREN	total	MG-Anteil	Phosphatidylanteil		
			total	Pos.1	Pos.2
12:0	5,2	1,9	6,1	0,3	12,0
14:0	12,2	12,3	13,7	4,3	23,2
16:0	31,6	47,3	25,6	22,9	28,4
16:1	32,8	16,8	36,3	47,8	24,8
18:0	1,4	2,1	1,1	0,3	2,0
18:1	16,9	19,5	18,7	27,7	9,8

stellung zwischen den in den beiden vorgenannten Verbindungen gefundenen Verhältnissen einnehmen. Sieht man von Phosphatidylglycerin ab, so läßt sich für die Phosphatidylreste der übrigen Phospho- und Phosphoglucolipide ein einheitliches Verteilungsmuster erkennen, wobei sich allerdings die C₁₆-Säuren in Position 1 gegenseitig in unterschiedlichem Ausmaß ersetzen.

Vergleicht man abschließend Glyko- und Phospholipide, so sind die Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung in Position 1 geringer als in Position 2; hier ist in den Phospholipiden ein Großteil der in den Glykolipiden vorherrschenden Octadecensäure durch Dodecan-, Tetradecan- und Hexadecensäure ersetzt.

Einen Sonderfall stellt der Monoacylrest aus Acylphosphatidylglycerin dar, da es sich hier um die Acylierung eines sn-Glycerin-1-phosphat-restes handelt. Für eine Acyltransferase von besonderer Spezifität sprachen Untersuchungen an aus *Salmonella typhimurium* isoliertem Acylphosphatidylglycerin, in dem der sn-Glycerin-1-phosphat-anteil mit einem extrem hohen Anteil (80 %) an Hexadecansäure verestert war (39).

Die von uns aus *S.haemolyticus* isolierte Verbindung läßt eine derartige Selektivität nicht erkennen (Tabelle 33).

In Tabelle 34 sind die für die einzelnen Lipide berechneten Molekülspezies aufgeführt. Der Unterschied zwischen Phosphatidylresten der Phospholipide und den Diglyceridanteilen der Glykolipide wird hier besonders deutlich: während bei letzteren Spezies mit kurzkettigen Fettsäuren (C_{12} , C_{14}) unter 2 % bleiben, liegen sie in den Phosphatidylanteilen zwischen 32 und 39 %, wenn man von Phosphatidylglycerin mit einem Anteil von nur 13 % absieht. Sie sind, wie schon aus den Verteilungsdiagrammen ersichtlich, in den Glykolipiden vorwiegend durch Spezies mit Octadecensäure in Position 2 ersetzt. Die Unterschiede, die für Fettsäurezusammensetzung und -verteilung innerhalb der Glykolipid- und Phospholipidreihe gefunden wurden, erklären sich aus Tabelle 34 als Anreicherung oder Verminderung bestimmter Spezies. So sind zum Beispiel in Di- und Triglycosyldiglycerid im Vergleich zu den Monohexosyldiglyceriden Molekülspezies mit Octadecensäure in Position 2 auf Kosten der in Position 2 Hexadecan- und Hexadecensäure enthaltenden Spezies vermehrt.

Die unten in Tabelle 34 aufgeführten Speziestypen zeigen, daß trotz der geringeren Positionsspezifität und der Unterschiede zwischen den einzelnen Lipiden auch hier der Hauptanteil aller Spezies (47 - 59 %) eine gesättigte und ungesättigte Fettsäure enthält. Auffallend gegenüber *S.faecalis* und *S.lactis* ist der relativ hohe Anteil der Kombination mit zwei gesättigten Fettsäuren (16 - 34 %), der in Phospholipiden höher als in Glykolipiden liegt: der Anteil ist zum Beispiel im Diphosphatidylglycerin mehr als doppelt so groß als in Di- und Triglycosyldiglycerid und

Tab. 33: Prozentuale Anteile der hauptsächlichsten Molekülspezies sowie der Speziestypen der Lipide aus *S. haemolyticus*. Zur Berechnung dienten die Werte aus Tabelle 32. Anteile anderer Kombinationen maximal 4 %; n.a., Werte mit maximal 2 %. Speziestypen, vgl. Tabelle 24.

KOMBINATION	Nacglic-			DGDG - Anteil aus Phosphoglucolipid					Phosphatidylrest Phosphoglucolipid					
	MGDG	DG	DGDG	TGDG	I	II	III	V	PG	DPG	PG aus AC-PG	I	II	III
16:0/12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	5	4	3	5	5	5
16:0/14:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	15	12	5	9	9	10
16:0/16:0	18	17	13	12	16	17	18	16	8	14	7	10	9	11
16:0/16:1	6	5	4	4	7	8	6	4	10	10	6	9	9	12
16:0/18:1	16	15	23	25	14	18	15	21	7	5	2	4	3	4
16:1/12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	6	5	6	4
16:1/14:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5	7	11	9	11	8
16:1/16:0	14	14	9	8	12	10	12	7	5	9	14	11	10	9
16:1/16:1	5	4	3	3	5	4	4	2	3	6	12	9	10	10
16:1/18:1	13	12	17	16	10	10	11	10	3	3	5	4	4	3
18:1/12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	3	3	3	2
18:1/14:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6	6	8	5	5	5
18:1/16:0	9	11	8	7	12	10	12	12	17	6	9	6	5	5
18:1/16:1	3	3	2	3	5	5	4	3	9	5	8	5	5	6
18:1/18:1	9	10	14	15	10	11	10	16	8	2	3	2	2	2
Summe, Spezies mit 12:0 und 14:0									13	34	36	36	39	39
Speziestypen														
GG	21	21	16	14	21	20	21	19	27	34	18	27	26	29
GU, UG	51	50	47	47	51	50	50	50	50	50	59	53	53	51
UU	30	29	36	36	30	30	29	31	22	16	26	20	20	20

wird durch entsprechende Verminderung der Spezies mit zwei ungesättigten Fettsäuren kompensiert. Aufgrund dessen sind Unterschiede im physikalisch-chemischen Verhalten zu erwarten, deren Ausmaß allerdings nur experimentell ermittelt werden kann.

VI. DISKUSSION

VI.1 Fettsäuremuster und Fettsäuresynthese. Die untersuchten Streptococcenstämmen haben in ihren polaren Lipiden alle dasselbe relativ einfache Fettsäuremuster, das in der gesättigten Reihe Tetra- bis Hexadecansäure, in der ungesättigten Reihe Tetra- bis Octadecansäure umfaßt. Dodecansäure tritt sporadisch, Octadecansäure stets nur in sehr geringer Menge auf. Anteilig sind die verschiedenen Fettsäuren in den einzelnen Stämmen unterschiedlich vertreten; in den Stämmen von *S. faecalis* findet man einen Teil der Octadecansäure in C_{19} -Cyclopropansäure überführt.

Bei allen Stämmen liegt in der gesättigten Reihe der maximale Anteil bei C_{16} , in der ungesättigten jedoch bei C_{18} (Abbildung 17, obere Reihe). Eine ähnliche bimodale Verteilung beider Reihen läßt sich auch für andere grampositive und gramnegative Bakterien zeigen, ist aber nicht generell realisiert (Abbildung 17).

Zur Diskussion dieses bisher unbeachtet gebliebenen Phänomens wird kurz auf die bakterielle Fettsäuresynthese eingegangen, die bisher am intensivsten für *Escherichia coli* untersucht ist (3).

Die meisten Bakterien besitzen die Fettsäuresynthetase II, in der die Einzelenzyme nicht zu einem stabilen Multienzymkomplex zusammengeschlossen sind (94). Eine zentrale Stellung nimmt das Acyl-Carrier-Protein (ACP) ein, an dessen 4'-Phosphopantetheinanteil die Intermediate und Endprodukte in Thioesterbindung verankert sind. Zunächst werden der für die Initiation notwendige Acetyl- und Malonylrest aus der Thioesterbindung von Coenzym A (CoA) auf die Sulfhydrylgruppe je eines ACP übertragen, worauf der Acetylrest aus Acetyl-ACP auf eine SH-Gruppe des kondensierenden

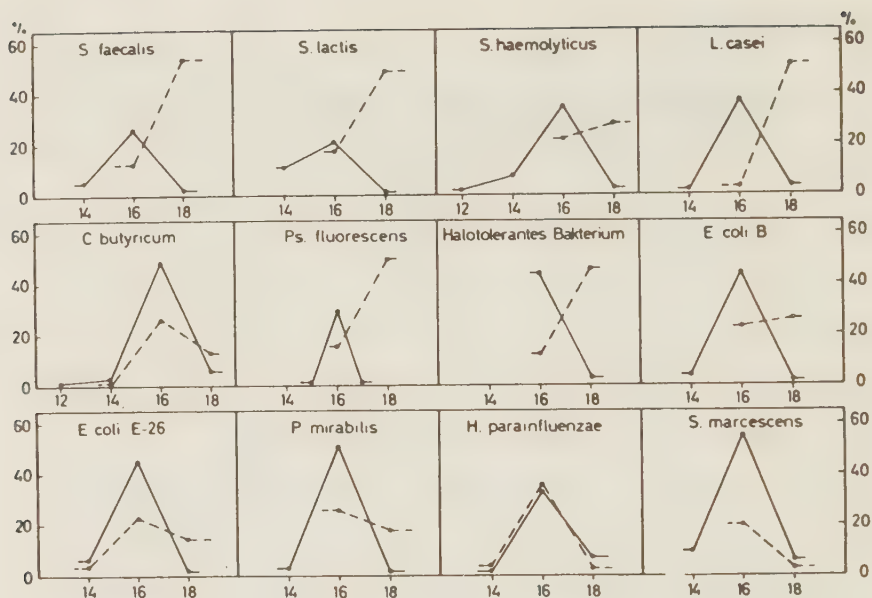


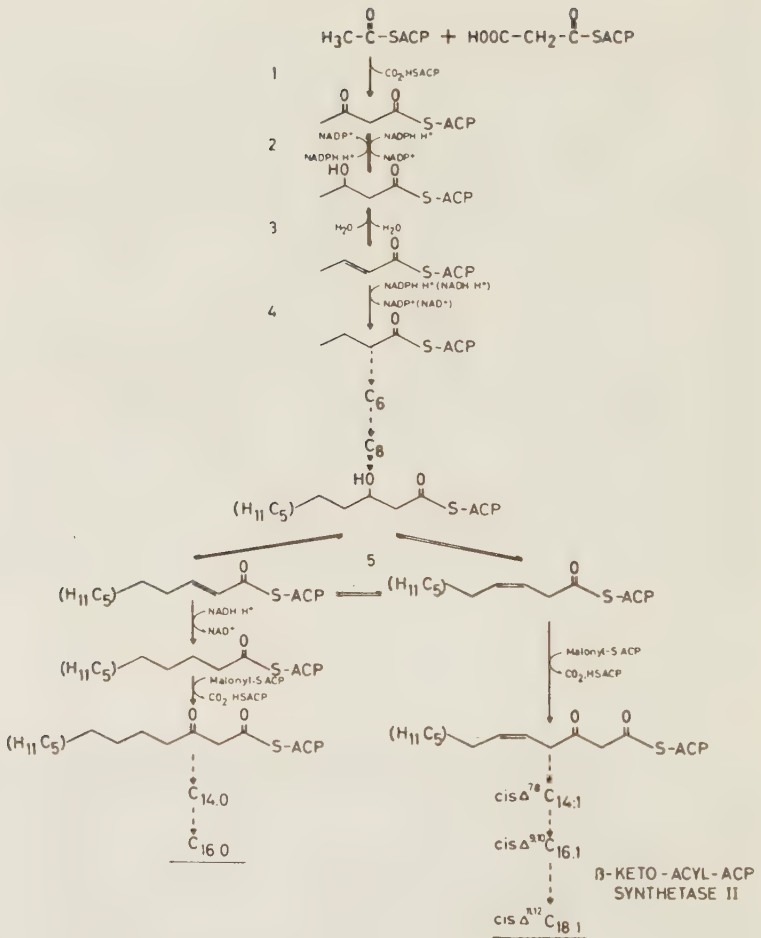
Abb. 17: Gehaltsprofile der Fettsäurezusammensetzungen bei verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterien. Symbole: ●—● gesättigte Fettsäuren —●— Monoensäuren und zugehörige Cyclopropanensäuren. Ordinate: Anteil der entsprechenden Fettsäuren in %; Abzisse: Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäuren. Aus der grampositiven Gruppe sind nur Stämme solcher Gattungen aufgeführt, die wie die gramnegativen Bakterien nur gesättigte, unverzweigte Fettsäuren und unverzweigte Monoensäuren entsprechend Schema 19, Seite 116 synthetisieren. Cyclopropanensäuren (C_{17} und C_{19}) wurden zu denjenigen Monoensäuren gerechnet, aus denen sie bei der Biosynthese entstehen. Die Fettsäurezusammensetzungen der Lipidextrakte der ersten drei Stämme (links oben) wurden von uns ermittelt, die übrigen Angaben sind der Literatur entnommen. Für das halotolerante Bakterium (90) ist die Fettsäurezusammensetzung von Diphosphatidylglycerin, für *Haemophilus parainfluenzae* (142) Phosphatidylglycerin als Beispiel gewählt worden. Die Fettsäurezusammensetzungen dieser Verbindungen entsprechen denen der übrigen Lipide der Stämme. Von den weiteren Stämmen konnten die Fettsäurezusammensetzungen der Gesamtlipidextrakte aufgeführt werden: *Lactobacillus casei* (l.c.88), *Clostridium butyricum* (l.c.89), *Pseudomonas fluorescens* (l.c.58), *Escherichia coli B* (l.c.58), *E. coli E-25* (l.c.91), *Proteus mirabilis* (l.c.92), *Serratia marcescens* (l.c.93).

Enzyms in Thioesterbindung übernommen wird. Die weiteren Reaktionen sind in Schema 19 gegeben.

Nach der durch die β -Ketoacyl-ACP-Synthetase katalysierten Kondensation (Reaktion 1) wird das entstandene β -Ketoacylderivat durch die NADPH-abhängige β -Ketoacyl-ACP-Reduktase zum β -Hydroxyderivat hydriert (Reaktion 2), das nun seinerseits durch die β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydrase in trans-2-Enoyl-ACP überführt wird (Reaktion 3). Der erste Umlauf wird beendet, indem die Doppelbindung durch Enoyl-ACP-Reduktase hydriert wird (Reaktion 4). Ein NADPH-abhängiges Enzym zeigt die höchste Aktivität mit C_4 - und C_6 -Derivaten, ein NADH-abhängiges Enzym hat eine breitere Kettenlängenspezifität. Für den nächsten Umlauf wird der Acylrest aus Acyl-ACP wieder von der SH-Gruppe der β -Ketoacyl-ACP-Synthetase übernommen, worauf erneute Kondensation mit Malonyl-ACP erfolgt, der sich wie beim ersten Umlauf erste Reduktion, Dehydratisierung und zweite Reduktion anschließen. Dieser Zyklus wird wiederholt bis die definitive Kettenlänge der gesättigten Fettsäuren erreicht ist.

Wie bei allen anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien entstehen in E.coli die ungesättigten Fettsäuren auf anaerobem Weg, wobei die Synthese auf der Stufe von β -Hydroxydecanoyl-ACP aus dem Syntheseweg der gesättigten Fettsäuren abzweigt (Schema 19). Durch die β -Hydroxydecanoyl-Thioester-Dehydrase, ein multifunktionelles Enzym von hoher Kettenlängenspezifität wird durch Dehydratisierung 3-cis-Decenoyl-ACP gebildet (96, 98),¹⁾ dessen Doppelbindung unreduziert bleibt.

¹⁾ Für den detaillierten Funktionsmechanismus dieses multifunktionellen Enzyms sei auf die Übersichtsarbeiten verwiesen.



Schema 19: Biosynthese von gesättigten, unverzweigten Fettsäuren gerader Kohlenstoffzahl und der entsprechenden Monoensäuren in Bakterien. In Anlehnung an Vagelos (95), Bloch (96) und Rosenfeld et al. (97)

Die Kettenverlängerung des ungesättigten Acylrestes erfolgt durch dieselben Mechanismen und Enzyme, die in der gesättigten Reihe wirksam sind. Dadurch entsteht eine Serie ungesättigter Fettsäuren, die die Doppelbindung an C_7 vom Methylende her tragen. Die in Streptococcen nachgewiesenen Monoensäuren der n-7-Reihe (99) lassen auf einen analogen Syntheseweg schließen; die geringen Mengen an n-9-Monoensäuren, die hier auch gefunden werden (99, 100), sprechen dafür, daß die Dehydrase auch β -Hydroxy-dodecanoyl-ACP umsetzt.

Das oben aufgezeigte bimodale Verhalten stellt die Frage nach der Termination in der gesättigten und ungesättigten Reihe. Kürzlich wurde an E.coli gezeigt, daß für die Termination zwei Faktoren verantwortlich sind: die Kettenlängenspezifität der β -Ketoacyl-ACP-Synthetasen (101 - 103) und die Spezifität und Aktivität der Transacylasen (104), welche die Acylreste aus Acyl-ACP in die Biosynthese der Phosphatidsäure einschleusen. Aus E.coli wurden zwei β -Ketoacyl-ACP-Synthetasen isoliert, die gegenüber allen Intermediaten der gesättigten wie ungesättigten Reihe gleich aktiv sind. Von beiden wird Palmitoyl-ACP praktisch nicht umgesetzt, wodurch die gesättigte Reihe auf der Stufe von C_{16} terminiert wird. Die eine der beiden Synthetasen (I) zeigt für Palmitoleoyl-ACP eine geringe, die andere (II) eine hohe Aktivität, während beide mit cis-Vaccenyl-ACP praktisch nicht mehr reagieren. Dadurch wird die ungesättigte Reihe bei C_{18} terminiert, wobei für die letzte Verlängerung weitgehend Synthetase II verantwortlich ist. Eine Mutante von E.coli, in der die ungesättigte Reihe auf der Stufe von Palmitoleoyl-ACP terminiert wird (101), weist in dieselbe Richtung. An einer anderen

Mutante, in der Lipidsynthese und β -Oxidation defekt sind, konnte gezeigt werden, daß trotz der Kettenlängenspezifität der β -Ketoacyl-ACP-Synthetasen gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit 20 und 22 C-Atomen synthetisiert werden (102). Daraus schließt man, daß die Konkurrenz der Acyltransferasen mit den Synthetasen um langkettige Acyl-ACP-Derivate den Terminationsmechanismus komplettiert.

Mit den in *E.coli* gefundenen Mechanismen, die erstmals die unterschiedliche Termination in der gesättigten und ungesättigten Reihe verständlich machen, wäre auch das bimodale Verteilungsmuster in *Streptococci* und anderen Bakterien (Abbildung 17) zu erklären.

Die physiologische Bedeutung der Verlängerung von Palmitoleoyl- zu cis-Vaccenyl-ACP scheint darin zu liegen, daß die Anpassung des Fettsäuremusters an niedrige Temperaturen durch Vermehrung ungesättigter Fettsäuren fast ausschließlich über die Synthese von cis-Vaccenat erfolgt. Das läßt erwarten, daß die β -Ketoacyl-ACP-Synthetase II ein "temperatursensitives" Regelenzym ist. Inwieweit das auch für die oben genannten Bakterien gilt, bleibt noch zu prüfen.

VI.2 Fettsäureverteilung und Lipidsynthese

Die Verteilung der Fettsäuren auf die beiden Glycerinanteile der Lipide erfolgt bei *Streptococci* auf unterschiedliche Weise. Es lassen sich derzeit drei Verteilungstypen erkennen:

Typ I, nachweisbar in *S.faecalis* var. *faecalis*, *S.faecalis* var. *zymogenes* und *S.lactis*, zeigt Verteilung nach Kettenlänge mit kurzkettigen (C_{12} - C_{16}) gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in Position 2, mit Octadecen- und C_{19} -Cyclopropansäure in Position 1. Eine ähnlich scharfe Verteilung nach demselben Typ zeigt

Pseudomonas aeruginosa (105); derselbe Typ mit weniger scharfer Positionsspezifität wurde in einem halotoleranten Bakterium gefunden (106). Eine Verteilung nach Kettenlänge haben außerdem die Lipide derjenigen Bakterien, die nur verzweigt-kettige Fettsäuren besitzen (107 - 109).

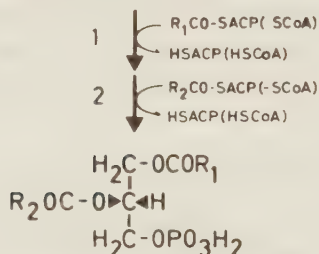
Typ II, nachgewiesen in einem Streptococcenstamm der Serogruppe B (22), zeigt Verteilung nach gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, wobei erstere vorwiegend in Position 1, letztere hauptsächlich in Position 2 verestert sind. Eine Ausnahme machen Dodecan- und Tetradecansäure, die wie die ungesättigten Fettsäuren in Position II stehen. Dieses Verteilungsmuster ist ganz offensichtlich am häufigsten realisiert: Es findet sich in *E.coli* (82, 83, 110) und *Serratia marcescens* (82), sowie mit gewissen Variationen auch in den Phospholipiden von Vertebraten (31) und höheren Pflanzen (84).

Typ III, nachgewiesen in *S.haemolyticus*, weist eine mehr oder minder zufallsbedingte Verteilung der Fettsäuren auf, wobei wieder die auf Position 2 beschränkten C_{12} - und C_{14} -Säuren eine Ausnahme machen. Ähnliche Verhältnisse finden sich bei *Agrobacterium tumefaciens*, wobei jedoch durch positionsspezifische Cyclopropanisierung eine gewisse Asymmetrie erreicht wird (82).

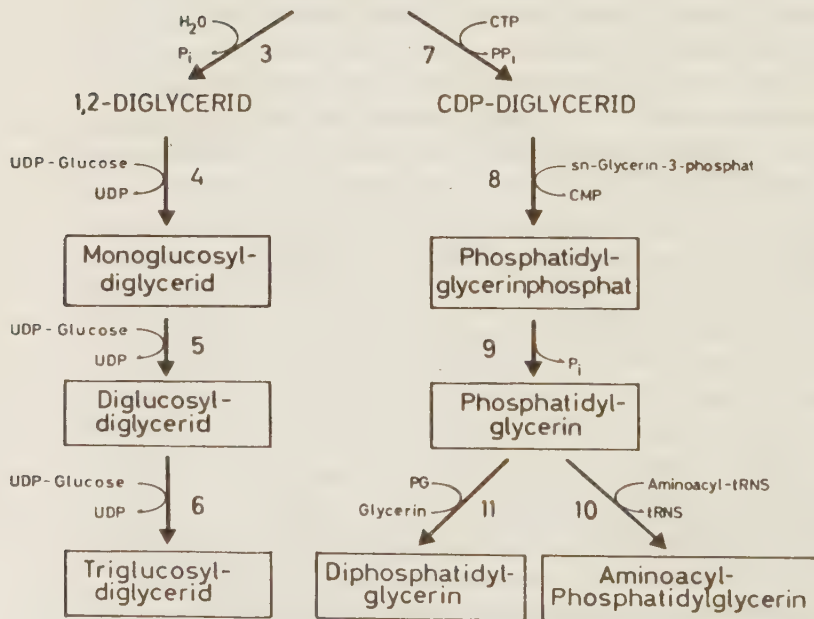
Es stellt sich die Frage, auf welche Weise das für die einzelnen Streptococcen charakteristische Fettsäureverteilungsmuster zustande kommt. Hierzu muß kurz auf die Biosynthesewege eingegangen werden, auf denen die einfachen Glyko- und Phospholipide entstehen. Die einzelnen Reaktionen, die an unterschiedlichen Mikroorganismen untersucht wurden, sind in Schema 20 und Tabelle 35 zusammengefaßt.

Zunächst wird *sn*-Glycerin-3-phosphat, das durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat aus dem Glykolyse-

sn-Glycerin-3-phosphat



PHOSPHATIDSÄURE



Schema 20: Biosynthese von Glyko- und Phospholipiden in Bakterien.

Für die Biosynthese von Glykolipiden ist als Beispiel die Übertragung von Glucosemolekülen gewählt worden. Bildung der Phosphatidsäure: vgl. Text, Seite 122. Die einzelnen Reaktionsschritte sind in Tabelle 35 zusammengefaßt.

Tab. 35: Enzymatische Reaktionen bei der Biosynthese von Glyko- und Phospholipiden in Bakterien. Reaktion Nr.: vgl. Schema 20

REAKTION Nr. (Schema 20)	Enzym	nachge- wiesen in
1	Acyl-ACP (CoA):sn-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase	<i>E.coli</i> (113-116), <i>C.butyricum</i> (120)
2	Acyl-ACP (CoA):Monoacyl-sn-glycerin-3-phosphat-Acyltransferase	<i>E.coli</i> (113-116), <i>C.butyricum</i> (120)
3	Phosphatidat-Phosphatase	<i>E.coli</i> (112), <i>B.subtilis</i> (122)
4	UDP-Glucose:1,2-Diacylglycerin-Glucosyltransferase	<i>S.faecalis</i> (123), <i>A.laidlawii</i> (124), <i>M.phlei</i> (125), <i>D.pneumoniae</i> (126)
	UDP-Galaktose:1,2-Diacylglycerin-Galaktosyltransferase	<i>B.bifidum</i> var. pennsylvanicus (127)
	GDP-Mannose:1,2-Diacylglycerin-Mannosyltransferase	<i>M.lysodeikticus</i> (128)
	UDP-Glucuronat:1,2-Diacylglycerin-Glucuronyltransferase	halotolerantes, leicht halophiles gramnegatives Bakterium (129)
5	UDP-Glucose:Glucosyldiglycerid-Glucosyltransferase	<i>S.faecalis</i> (123), <i>A.laidlawii</i> (124)
	UDP-Galaktose:Glucosyldiglycerid-Galaktosyltransferase	<i>D.pneumoniae</i> (126)
	UDP-Galaktose:Galaktosyldiglycerid-Galaktosyltransferase	<i>B.bifidum</i> var. pennsylvanicus (127)
	GDP-Mannose:Mannosyldiglycerid-Mannosyltransferase	<i>M.lysodeikticus</i> (128)
6	UDP-Galaktose:Digalaktosyldiglycerid-Galaktosyltransferase	<i>B.bifidum</i> var. pennsylvanicus
7	Phosphatidat-Cytidyltransferase	<i>E.coli</i> (l.c.130)
8	sn-Glycerin-3-phosphat:CMP-Phosphatidyltransferase	<i>E.coli</i> (l.c.130)
9	Phosphatidylglycerinphosphat-Phosphatase	<i>E.coli</i> (l.c.130)
10	Aminoacyl-tRNA:Phosphatidylglycerin-Aminoacyltransferase	<i>S.aureus</i> (l.c.131)
11	Phosphatidylglycerin:Phosphatidylglycerin-Phosphatidyltransferase	<i>E.coli</i> (132-134), <i>S.aureus</i> (135), <i>S.faecalis</i> (30), <i>M.lysodeikticus</i> (136), <i>L.plantarum</i> (137), fermentative und nicht fermentative, marine Bakterien (138)

weg entsteht, mit zwei Fettsäuren zu Phosphatidsäure verestert (Reaktion 1 und 2, Schema 20). Freies Glycerin (111) oder Dihydroxyacetonphosphat (112) werden nicht acyliert. Es handelt sich um eine Zweischnittreaktion (s. unten), für welche zwei unterscheidbare Acyltransferasen nachgewiesen sind (113 - 116). Als Acyldonatoren sind Acylderivate von Coenzym A (111, 116 - 119) und von Acyl-Carrier-Protein (112, 116, 120) nahezu gleich aktiv. Man nimmt an, daß die ACP-Derivate, die unmittelbar bei der Fettsäurebiosynthese entstehen (Schema 19), für die de-novo-Synthese der Lipide verwendet werden, während die Coenzym-A-Derivate beim Wiedereinbau von endogenen und beim Einbau von exogenen Fettsäuren eine Rolle spielen (112, 121).

Phosphatidsäure ihrerseits ist die Synthese-Vorstufe sowohl für Glykolipide als auch für Phospholipide, indem sie für erstere den Diglycerid-¹⁾ für letztere den Phosphatidylanteil liefert (Schema 20, Tabelle 35). Hydrolytische Abspaltung des Phosphatrestes durch eine spezifische Phosphatidat-Phosphat-ester-Hydrolase führt zu sn-1,2-di-O-Acylglycerin (Reaktion 3), das in Bakterien ausschließlich in die Glykolipidsynthese eingeht.¹⁾

Die Überführung in Mono- und Dihexosyldiglycerid erfolgt durch sequentiellen Glucosyltransfer aus UDP-Hexosen (Reaktion 4 und 5)²⁾. Soweit untersucht, werden die beiden Reaktionen durch zwei unterschied-

1) Im tierischen Organismus und in höheren Pflanzen ist Di-O-Acylglycerin auch Ausgangssubstanz für die Biosynthese von Triglyceriden, Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidylcholin.

2) Bei der Biosynthese von Monomannosyl- und Dimannosyldiglycerid in *Micrococcus lysodeikticus* ist GDP-Mannose Hexosyldonator (128).

liche Glykosyltransferasen katalysiert (124, 128). Beide Reaktionen wurden in *S. faecalis* nachgewiesen und die Reaktionsprodukte als α -Glucosyl- und α -Kojibiosyldiglycerid charakterisiert (123). In *S. haemolyticus* wird die Reihe der Glykolipide durch einen dritten, in vitro bisher nicht untersuchten Glucosyltransfer komplettiert.¹⁾

Für die Synthese der Phospholipide wird Phosphatidsäure durch Phosphatidat: CTP-Cytidyltransferase zum CDP-Diglycerid aktiviert (Reaktion 7), über das in Bakterien im Gegensatz zum tierischen Organismus und höheren Pflanzen (vgl. Fußnote der vorausgehenden Seite) die Synthese aller Phospholipide erfolgt. Aus CDP-Diglycerid wird der Phosphatidylrest zunächst auf Position 1 von sn-Glycerin-3-phosphat übertragen, wodurch Phosphatidylglycerinphosphat entsteht (Reaktion 8), das durch eine spezifische Hydrolase in Phosphatidylglycerin übergeführt wird (Reaktion 9). Phosphatidylglycerin, selbst Bestandteil bakterieller Cytoplasmamembran, ist seinerseits die Ausgangssubstanz für die Synthese der anderen Phospholipide. Es kann durch Aminoacyl-Übertragung aus Aminoacyl-tRNS in verschiedene Aminoacylderivate übergeführt werden (Reaktion 10). In allen bisher untersuchten Bakterien (132 - 138) entsteht auch Cardiolipin ausschließlich aus Phosphatidylglycerin, wobei der Phosphatidylrest aus einem Molekül auf Position 3 des sn-Glycerin-1-phosphat-Anteiles eines zweiten Moleküls übertragen wird (Reaktion 11)²⁾.

1) Offen bleibt derzeit, wie es in diesem Organismus zur Synthese von N-Acetyl- α -D-glucosaminyldiglycerid kommt. Eine Kettenverlängerung findet offensichtlich nicht statt, da die Diglucosyldiglyceridfraktion praktisch kein Hexosamin enthält.

2) In tierischen Zellen wird Cardiolipin durch Phosphatidyltransfer aus CDP-Diglycerid auf Phosphatidylglycerin synthetisiert (139).

Diesem Biosyntheseablauf, nach dem sich die Diglyceridanteile von Glyko- und Phospholipiden aus Phosphatidsäure als gemeinsamer Vorstufe ableiten, wird in der vorliegenden Arbeit erstmals eine systematische Analyse der Fettsäurezusammensetzung und Verteilung in Glyko- und Phospholipiden aus mehreren Bakterien gegenübergestellt.

Weitgehende Einheitlichkeit in Zusammensetzung¹⁾ und Verteilung wurde gefunden in:

- 1) Mono- und Diglucosyldiglycerid, Phosphatidylglycerin, Lysylphosphatidylglycerin und Cardiolipin von *S.lactis* (Abbildung 15, Seite 100).
- 2) Diglucosyldiglycerid, Phosphatidylglycerin und Cardiolipin von *S.faecalis*²⁾ (Abbildung 13, Seite 91).
- 3) sowie in sämtlichen Lipiden eines Streptococcenstammes der Serogruppe B (22).

Diese Einheitlichkeit entspricht dem in Schema 20 gegebenen Biosyntheseschema und führt zu folgenden Hypothesen:

- (i) Der Phosphatidsäure-Pool ist für Phospho- und Glykolipide einheitlich, wenn nicht identisch.
- (ii) Das Fettsäure-Make-up wird bei den oben genannten Stämmen auf der Stufe der Phosphatidsäure festgelegt.
- (iii) An den Abzweigstellen des Biosynthese-Schemas erfolgt keine wesentliche Selektionierung bestimmter Molekülspezies.

¹⁾ Auf den unterschiedlichen Gehalt an Tetradeconsäure in den Glyko- und Phospholipiden von *S.faecalis* und *S.lactis* wird später eingegangen (Seite 129).

²⁾ Monoglucosyldiglycerid wurde nicht isoliert, Aminoacyl-Phosphatidylglycerin nicht gefunden (vgl. Abbildung 4, Seite 15).

- (iv) De- und Reacylierungen an den fertigen Lipiden spielen für das definitive Fettsäuremuster keine nennenswerte Rolle.¹⁾

In Übereinstimmung mit (ii) steht der experimentelle Nachweis, daß in *Clostridium butyricum* (120) und *E.coli* (112, 113, 116, 119, 130) die Positionsverteilung der Fettsäuren bei der Synthese der Phosphatidsäure erfolgt. Ausgehend von sn-Glycerin-3-phosphat wird durch Acyltransferase I Position 1 acyliert, während Transferase II die Position 2 des 1-Monoacyl-sn-glycerin-3-phosphats verestert (112, 118, 120). Dem definitiven Fettsäureverteilungsmuster der Lipide entsprechend hat in *Clostridium butyricum* Transferase I eine hohe Affinität zu ungesättigten Acyl-ACP-Spezies, Transferase II dagegen zu gesättigten (120), während in *E.coli* die Spezifitäten genau umgekehrt liegen (112, 118, 119). Wie in *Clostridium butyricum* (120) ist zumindest in bestimmten Stämmen von *E.coli* (118), 119) die Spezifität der Acyltransferasen nicht absolut: Bei Angebot von nur einer Acyl-CoA-Spezies werden Phosphatidsäuren gebildet, die in beiden Positionen die gleiche gesättigte oder ungesättigte Fettsäure tragen (111, 118, 119), während gleichzeitiges Angebot von gesättigten und ungesättigten Acyl-CoA-Spezies zum charakteristisch positionsspezifischen Einbau

¹⁾ Hierzu sei angemerkt, daß die Freisetzung von Fettsäuren aus Phospholipiden durch Phospholipasen, aus Glykolipiden jedoch durch Lipasen erfolgt und für eine Reacylierung der Lysoverbindungen wahrscheinlich auch verschiedene Acyltransferasen notwendig wären, so daß die Aktivität eines derart multiplen und heterogenen Systems kaum zu der gefundenen Einheitlichkeit führen würde.

führt (119)¹⁾. Das Verteilungsmuster wird nach diesen Ergebnissen einerseits durch die relative Spezifität der Acyltransferasen, andererseits durch das Angebot der Fettsäuren aus der Biosynthese bestimmt. In Übereinstimmung damit werden Änderungen des Fettsäuremusters zur Anpassung an veränderte Temperaturen (78) sowohl auf der Stufe der Acyltransferasen (113, 119) als auch über die Biosynthese der ungesättigten Fettsäuren (104) reguliert: Bei Down-Shift steigt die Synthese von *cis*-Vaccenyl-ACP an; andererseits wird *in vitro* aber auch bei gleicher Konzentration an gesättigten und ungesättigten Acyldonatoren vermehrt *cis*-Vaccenat auf Kosten von Palmitat in Position 1 der Phosphatidsäure eingebaut. Nach anderen Ergebnissen sind die an der Synthese der Phosphatidsäure in *E.coli* beteiligten Acyltransferasen spezifischer: Danach werden bei der ersten Acylierung von Glycerinphosphat Palmitinsäure fast ausschließlich in Position 1, ungesättigte Fettsäuren vorzugsweise in Position 2 eingebaut (113, 116). Aus indirekten, aber recht schlüssigen Ergebnissen wurde gefolgert, daß ein einzelnes Enzym den Transfer von Palmitat auf Position 1 sowie den Transfer ungesättigter Fettsäuren auf Position 2 des Glycerinphosphats katalysiert (116)²⁾.

1) Die nur relative Spezifität äußert sich auch darin, daß in *E.coli* nicht vorkommende Fettsäuren mit mehrfachen oder *trans*-Doppelbindungen, unterschiedlicher Lokalisation der Doppelbindung oder ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen in die Phosphatidsäure und Phospholipide von *E.coli* eingebaut werden (83, 111, 140).

2) Bis jetzt fehlt jedoch der Nachweis, daß 2-Acyl-sn-glycerin-3-phosphat weiter zu Phosphatidsäure acyliert wird. In einem anderen *in vitro*-System aus *E.coli* wurde das 2-Acyl-derivat weder acyliert noch hemmte es, wie das 1-Isomer, den Einbau von ¹⁴C-Glycerinphosphat in Phosphatidsäure (118).

Wenn, wie oben postuliert, in *S. faecalis*, *S. lactis* und *Streptococcus B* die Positionsverteilung auf der Stufe der Phosphatidsäure festgelegt wird, ist aufgrund der prägnanten Fettsäureverteilung eine relativ hohe Spezifität der an der Synthese der Phosphatidsäure beteiligten Acyltransferasen zu fordern. In *S. faecalis* und *S. lactis* hatte Acyltransferase I eine hohe Selektivität für *cis*-Vacccenat, in *Streptococcus B* hingegen für Palmitat und Stearat, während Acyltransferase II im ersten Fall gesättigte und ungesättigte C_{14} - und C_{16} -Fettsäuren, im zweiten Fall Laurat, Myristat, Palmitoleat und *cis*-Vacccenat bevorzugen würde. Bei beiden Typen ist die Selektivität für *cis*-Vacccenat nicht absolut. Es kann deshalb vermutet werden, daß bei einem Temperatur-Down-Shift die Vermehrung der ungesättigten Fettsäuren hier wie in *E. coli* über einen vermehrten Einbau von *cis*-Vacccenat in Konkurrenz zu Palmitat und/oder Stearat erfolgt.

Eine relativ geringe Spezifität der Acyltransferasen I und II würde schließlich in *S. haemolyticus* die hier als weitgehend zufallsbedingt gefundene Verteilung der Fettsäuren erklären.

VI.3 Modifikation der Lipide in *S. faecalis*: Bildung von C_{19} -Cyclopropansäure

S. faecalis ist das erste grampositive Bakterium, in dem bisher Vorkommen und Positionsverteilung von Cyclopropansäuren in den Einzellipiden untersucht wurden (Abbildung 13 und 14, Seite 91 und 95). Analoge Ergebnisse liegen derzeit nur über gramnegative Bakterien vor. Hier ist die Zunahme von Cyclopropansäuren mit einem stöchiometrischen Verlust der entsprechenden ungesättigten Fettsäuren verbunden. Ein Enzym, das die ungesättigten Acylreste intakter Phospholipide

in die Cyclopropanderivate überführt, ist für mehrere Bakterien beschrieben (3); Methyltransferase ist Methionin in Form von S-Adenosyl-Methionin (3). Das Enzym aus *Clostridium butyricum*, das ungesättigte Fettsäuren in Phospholipiden methyliert, ist inaktiv gegenüber ungesättigten freien Fettsäuren und Acyl-Coenzym-A-Derivaten (3). Deshalb betrachtet man Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren als die *in vivo*-Substrate der Cyclopropansynthetase. Aus der Tatsache, daß in *E.coli* die einzelnen Phospholipide in unterschiedlichem Ausmaß und mit verschiedener Geschwindigkeit *in vivo* methyliert werden, schloß man hier auf analoge Verhältnisse (130).

In *S.faecalis* findet man die verschiedenen Lipide unterschiedlich methyliert und, was wesentlicher erscheint, in allen Fällen ist Octadecensäure stöchiometrisch durch C_{19} -Cyclopropansäure ersetzt (vgl. Seite 88). Das läßt erwarten, daß auch hier die Cyclopropanisierung nicht auf der Stufe von *cis*-Vaccenyl-ACP, sondern an den fertig synthetisierten Lipiden erfolgt. In Erweiterung der bisherigen Vorstellung müßten hier nicht nur Phospholipide, sondern auch die verschiedenen Glykolipide als Substrate der Cyclopropansynthetase wirksam sein. Wie Phosphoglucolipid V und VI zeigen (Abbildung 13 und 14, Seite 91 und 95), scheint ein Glycerinphosphat-Substituent am Disaccharidanteil die Affinität beträchtlich herabsetzen. Hervorgehoben sei die ausschließliche Spezifität der *S.faecalis*-Cyclopropansynthetase für Position 1 (Abbildung 13 und 14, Seite 91 und 95). Ob sich hierin eine Kettenlängenspezifität äußert, wobei nur C_{19} -Cyclopropansäure entsteht, läßt sich derzeit nicht entscheiden, da Palmitoleinsäure, die Vorstufe von C_{17} -Cyclopropansäure, nur in Position 2 eingebaut ist.

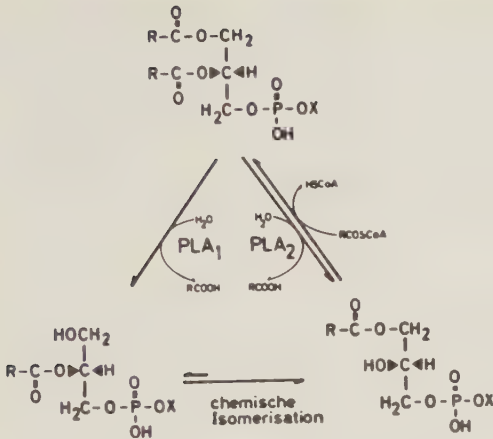
VI.4 Modifikation der Lipide in S.haemolyticus: De- und Reacylierung oder Spezies-Selektionierung.

Von *S.faecalis* über *S.lactis* bis hin zu *S.haemolyticus* findet man zunehmende Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Glyko- und Phospholipidreihe. Bei *S.faecalis* zeigt sich in den Phospholipiden gegenüber den Glykolipiden eine eben erkennbare, bei *S.lactis* eine deutlichere Vermehrung der Tetradecensäure, wobei Hexadecansäure entsprechend vermindert ist. Im Verteilungsmuster äußert sich dieser Unterschied in Position 2. Phospho- und Glykolipidreihe sind bei beiden Stämmen jedoch in sich einheitlich (Abbildung 13 und 15, Seite 91 und 100). Bei *S.haemolyticus* unterscheiden sich die beiden Lipidreihen wesentlich stärker, so daß in der Fettsäurezusammensetzung eine Verwandtschaft nur schwer erkennbar ist (Tabelle 32, Seite 106). Das Verteilungsmuster zeigt jedoch für die meisten Lipide eine ähnliche Zusammensetzung der Position 1, während die Unterschiede weitgehend in Position 2 manifestiert sind. Hier ist die in den Glykolipiden dominierende Octadecensäure in den Phospholipiden zum Großteil durch Hexadecan-, Tetradecan- und Dodecansäure ersetzt (Abbildung 16, Seite 107). Im Gegensatz zu *S.faecalis* und *S.lactis* finden sich bei *S.haemolyticus* auch Unterschiede innerhalb der beiden Lipidreihen.

Eine Möglichkeit, das Fettsäuremuster von Phospholipiden nach der Biosynthese zu ändern, besteht im Zusammenwirken von Phospholipase A_1 und A_2 und von Acyltransferasen, welche die durch die Phospholipasen entstandenen Lyso-phospholipide reacylieren (Schema 21). In Säugerorganen sind beide Enzymgruppen nachgewiesen; für die Acyltransferasen sind unterschiedliche Selektivitäten für bestimmte Acyl-CoA-Spezies und Positions-

spezifität am Lyso-Lipid beschrieben (69). Dieser De- und Reacylierungs-Mechanismus (Lands-Zyklus) ist auch in vivo wirksam und für die Synthese bestimmter Molekülspezies von Phosphatidylcholin, Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidylinositol verantwortlich; häufig wird hierdurch Aradochinat in Position 2 eingeführt (vgl. 69). Die Notwendigkeit des Lands-Zyklus in Säugerzellen ist verständlich, da dort Phosphatidsäure nicht nur die Vorstufe von Strukturlipiden sondern auch Vorstufe für die nur als Energiereserve dienenden Triglyceride ist.

Unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung in den Zelllipiden aus Bakterien wird in analoger Weise durch De- und Reacylierung erklärt (z. B. 141); als unterstützender Hinweis werden Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidsäure und Strukturlipiden, wie sie in *S.aureus* (141) und *Haemophilus parainfluenzae* (142) gefunden wurden, gewertet (76). Direkter ist der Nachweis, daß bei *Haemophilus parainfluenzae* die Fettsäuren in Position 2 von Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidylglycerin einen rascheren Turnover zeigen als die Fettsäuren in Position 1 und überdies auch Unterschiede im Turnover der einzelnen Fettsäuren gefunden wurden (76). In *Staphylococcus aureus* hingegen zeigen Mono- und Diglucosyldiglycerid einen raschen Turnover der Glucosylreste, während der Diglyceridanteil stabil bleibt (143), obwohl sich gerade in *S.aureus* die beiden Glykolipide hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung unterscheiden (141). Stabilität der Diglyceridanteile in Glyko- und Phospholipiden wurde zumindest während der Wachstumsphase auch in *Acholeplasma laidlawii* gefunden (144).



Schema 21: Fettsäureumbau durch De- und Reacylierung in Phospholipiden, in Anlehnung an l.c. 146. Acylierung von 1-Desacylverbindungen wurde im Säugerorganismus nachgewiesen (vgl. Übersichtsreferat, l.c. 69), bei Bakterien jedoch bisher nicht untersucht.

In *E.coli* konnte der für den De- und Reacylierungs-Zyklus erforderliche Enzymsatz nachgewiesen werden (Schema 21): Neben Lysophospholipasen findet sich Phospholipase A_1 bzw. Phospholipase A_2 (145, 146)¹⁾; außerdem ist eine Acyltransferase vorhanden, die den Oleyl-Rest von Coenzym A auf 1-Acyl-glycerophosphoryl-äthanolamin und -cholin überträgt (147). Das Vorhan-

¹⁾ Phospholipasen wurden auch in zahlreichen anderen Bakterien nachgewiesen (Übersichtsreferat, vgl. 69). Interessant zur Frage der Funktion von Phospholipasen für einen De- und Reacylierungszyklus ist die Beobachtung, daß *B.subtilis* (Wildtyp) eine inaktive Phospholipase A_1 enthält; das Enzym wird in einer Mutante aktiv, die einen Proteininhibitor der Phospholipase verloren hat (151). Die Mutante zeigt einen intensiven Abbau der Lipide und ist osmotisch fragil. Über die Regulierbarkeit des Systems im Wildtyp ist derzeit noch nichts bekannt.

densein dieser Enzyme ist besonders interessant, da sich in *E.coli* die drei hauptsächlichen Membranlipide, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylglycerin und Cardiolipin, wenn auch nicht grundsätzlich, in ihrer Fettsäurezusammensetzung unterscheiden (110, 148 - 150). Während des normalen Wachstums scheint der Lands-Zyklus jedoch keine Rolle für die Differenzierung von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylglycerin zu spielen, da nach Doppelmarkierung mit ^{14}C -Acetat und ^3H -Glycerin bei Übergang in nicht-markiertes Medium der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ Quotient¹⁾ im Phosphatidylanteil der sämtlichen Molekülspezies beider Lipide konstant bleibt (119). Die Unterschiedlichkeit im definitiven Gesamtfettsäuremuster scheint durch metabolische Uneinheitlichkeit zustande zu kommen: Phosphatidyläthanolamin ist weitgehend stabil; zwei von den fünf Molekülspezies bleiben konstant; die Palmityl-palmitoleoyl-Spezies wurde cyclopropanisiert und abgebaut wurde lediglich die cis-Vaccenyl-palmitoleoyl-Spezies. Alle Phosphatidylglycerin-Molekülspezies, ausgenommen solche mit zwei gesättigten Fettsäuren, nahmen hingegen ab und zwar mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, wobei die Palmityl-cis-vaccenyl-Spezies den raschesten Umsatz aufwies (119).

Die einzige Bedingung, unter der der Lands-Zyklus in *E.coli* in Aktion zu treten scheint, ist der Temperatur-Down-Shift (110), wobei vermehrt cis-Vaccenat synthetisiert und in die Phospholipide eingebaut wird (104, 110, 112): Führt man den Shift nach Doppelmarkierung (^{14}C -Acetat, ^3H -Glycerin) und Übergang in nicht-markiertes Medium durch, fällt in Phosphatidylglycerin

1) ^{14}C wird vorwiegend in die Acylreste, ^3H in die Glycerinanteile eingebaut.

das $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis, was auf einen Austausch der neugebildeten, nicht-markierten cis-Vaccensäure gegen eine im Lipid gebundene, wahrscheinlich gesättigte ^{14}C -Fettsäure schließen läßt (110). In Phosphatidyläthanolamin, dem hauptsächlichen Lipid von *E.coli*, (70 % des Gesamt-Lipid-Phosphats), blieb selbst unter diesen Bedingungen $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ konstant, so daß der hier auch nachweisbare Einbau von cis-Vaccenat über de-novo-Synthese erfolgt (110).

Ein zweiter, weniger oft diskutierter Weg, der zu unterschiedlichen Fettsäuremustern in den Einzellipiden führt, ist die Spezies-Selektionierung auf verschiedenen Stufen der Lipid-Biosynthese (Schema 20). Auf die in *S.haemolyticus* gefundenen Verhältnisse angewendet (Abbildung 16, Tabelle 32, Seite 106 und 107), würde das bedeuten, daß Phosphatidsäure-Spezies mit Hexadecan- und Octadecensäure in Position 2 vorzugsweise dephosphoryliert (Schema 20, Reaktion 3) und in die Glykolipidsynthese einlaufen würden, während solche mit kurzkettigen Fettsäuren in Position 2 bevorzugt zu CDP-Diglycerid aktiviert (Schema 20, Reaktion 7), in die Biosynthese oder Phospholipide gelangen. Bei der weiteren Glucosylierung zum Di- und Triglycosyldiglycerid würden Spezies mit Octadecensäure in Position 2 bevorzugt (Tabelle 32). Das nicht in die Phospholipidreihe passende Muster von Phosphatidylglycerin (Abbildung 16, Seite 107) spricht nicht gegen, sondern eher für die Selektionierungs-Hypothese, da es Ausgangssubstanz für die Synthese von Cardiolipin, Acylphosphatidylglycerin, Phosphoglucolipid V und von Lipoteichonsäure ist (152, 153). Hinzu kommt, daß

erst in der stationären Phase geerntet wurde, in der keine Lipidsynthese mehr stattfindet, und das verbliebene Phosphatidylglycerin nurmehr 3 % vom Lipidphosphat betrug. Acylphosphatidylglycerin, das an den vorausgehend genannten "selektionierenden" Reaktionen nicht teilnehmen kann, hätte dann das ursprüngliche Fettsäuremuster besser bewahrt (Abbildung 16, Seite 107).¹⁾

In *S.faecalis* und *S.lactis* liegen die Verhältnisse einfacher: Hier müßten C_{14} -haltige Phosphatidsäure-Spezies nur beim Abzweig zum CDP-Diglycerid geringfügig bevorzugt werden. Weitere Selektionierungen bei den anschließenden Synthesereaktionen innerhalb von Phospho- und Glykolipidreihe scheinen nicht zu erfolgen.

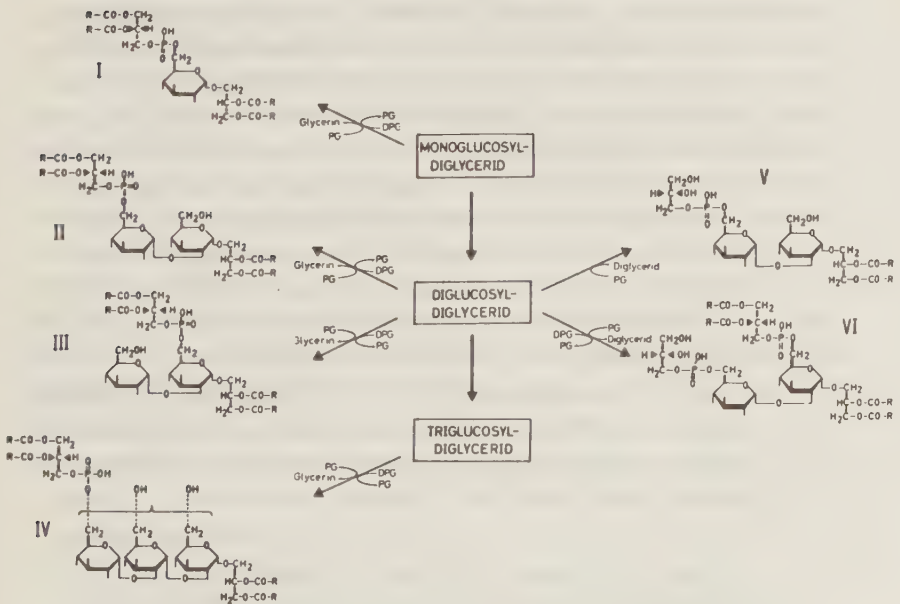
Mit Ausnahme der oben erwähnten Untersuchungen an *E.coli* (110), wurden metabolische Selektionierungen bestimmter Molekülspezies bisher nicht beschrieben. Für die Biosynthese der eingangs erwähnten Phospholipid-Spezies aus Säugerorganen, deren Fettsäuremuster durch De- und Reacylierung entsteht, konnte zumindest in vitro keine Selektionierung bestimmter Diglycerid- bzw. Phosphatidat-Spezies nachgewiesen werden (69). In Bakterien wurde bisher das Problem nur für die Hexosyltransferasen untersucht, die für die Biosynthese der Glykolipide verantwortlich sind. In einigen Fällen wurde eine gewisse Selektivität gefunden (123, 124, 127, 128), die jedoch zu gering wäre, um die für die Glykolipidsynthese in *S.haemolyticus* erforderliche Selektionierung zu erklären. Unter dem Gesichtspunkt der oben diskutierten "relativen" Spezifität der an der Phosphatidsäure-Biosynthese beteiligten Acyl-Transferasen (vgl. Seite 125) sind jedoch alle bisherigen Versuche unzulänglich, da in keinem Fall verschiedene Spezies gleichzeitig angeboten und ihr Einbau in das Endprodukt ermittelt wurde.

¹⁾Voraussetzung hierfür ist, daß der dritte Acylrest in Acyl-PG keinen oder nur einen sehr langsamen Turnover hat.

Es bleibt daher noch offen, welcher der beiden diskutierten Wege in *S. haemolyticus* für die Divergenz im Fettsäuremuster der Phospho- und Glykolipidreihe verantwortlich ist. Wegen der deutlichen Divergenz ist *S. haemolyticus* besonders geeignet, um die Bedeutung von De- und Reacylierung oder einer Selektionierung von Molekülspezies in Bakterien zu prüfen.

VI.5 Fettsäurepositionsverteilung und Biosynthese von Phosphoglucolipiden

Über die Biosynthese von Phosphoglucolipiden ist noch wenig bekannt. Nachgewiesene und hypothetische Reaktionen sind in Schema 22 zusammengefaßt. Es kann kein



Schema 22: Biosynthese von Phosphoglucolipiden. Inwieweit die aufgeführten Reaktionsschritte nachgewiesen sind oder angenommen werden, vgl. Text.

Zweifel bestehen, daß die Biosynthese der Phosphogluco-
lipide von den einfachen Glykolipiden ausgeht, da die
Glykolipidanteile der ersteren mit den Glykolipiden
nicht nur in der Struktur des desacylierten Core, son-
dern auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, in der Zu-
sammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren
übereinstimmen (Abbildung 13, 14, 15, 16, Seite 91,
95, 100, 107).

Alle Stämme von *S.faecalis* synthetisierten Phospho-
glucolipid I¹⁾, III, V und VI (20), wobei Phosphogluco-
lipid III die Hauptkomponente ist (Abbildung 4, Seite 15)
und, stammabhängig, 8 - 28 % der Membranlipidmoleküle
stellt (22). Mit einer Partikelfraktion aus *S.faecalis*
ATCC 9790 wurde gezeigt, daß Kojibiosyldiglycerid in
ein anionisches Produkt übergeht (123), das späterhin
mit einiger Wahrscheinlichkeit als Phosphogluco-
lipid III charakterisiert wurde (28). Durch Inkubation der
Partikelfraktion mit Kojibiosyldiglycerid und ³²P-
Phosphatidylglycerin oder ³²P-Cardiolipin ließ sich
ein Einbau von ³²P- aus beiden Phospholipiden in ein
Phosphogluco-
lipid nachweisen (30). Leider wurde das
Reaktionsprodukt nur in der desacylierten Form chro-
matographisch identifiziert, so daß offen bleibt, ob
es sich um Phosphogluco-
lipid III oder V handelte. Ein-
deutig sind bisher nur die Ergebnisse über die Bio-
synthese von Phosphogluco-
lipid I in *Pseudomonas diminuta*
bei welcher der Phosphatidylrest selektiv aus Phos-
phatidylglycerin übertragen wurde; Cardiolipin war
als Donator unwirksam (12). Unsere Ergebnisse an Phos-
phogluco-
lipid III aus *S.faecalis* sind mit einem ana-

1) Phosphogluco-
lipid I entging bei der seinerzeiti-
gen Isolierung unserer Aufmerksamkeit, läßt sich
aber mit Hilfe der aus *S.haemolyticus* isolierten
Verbindung nun in allen Lipidrohextrakten chro-
matographisch einwandfrei identifizieren.

logen Phosphatidyltransfer vereinbar, da der Phosphatidylrest des Phosphoglucolipids sowohl hinsichtlich seiner Stereokonfiguration (19), als auch in der Zusammensetzung und Positionsverteilung der Fettsäuren mit den Phosphatidylgruppen aus Phosphatidylglycerin und Cardiolipin übereinstimmt (Abbildung 13, Seite 91). Da wir in *S. faecalis* im Gegensatz zu *S. haemolyticus* kein Phosphoglucolipid II fanden, muß der Phosphatidyltransfer streng spezifisch auf die primäre Alkoholgruppe der mittleren Glucose von Kojibiosyldiglycerid erfolgen¹⁾

Bei Auffinden des ungewöhnlichen, nicht acylierten sn-Glycerin-1-phosphatrestes in Phosphoglucolipid V postulierten wir als wahrscheinlichen Donator dieser Gruppe Phosphatidylglycerin (18), das einzige Molekül in Bakterien, das sn-Glycerin-1-phosphat in Diesterbindung enthält. Unveröffentlichte Ergebnisse über die Biosynthese der analogen Phosphoglykolipide aus *Bifidobacterium bifidum* (154) und *S. epidermidis* (27) weisen in dieselbe Richtung. Die Herkunft aus Kojibiosyldiglycerid wird durch das Fettsäuremuster in Phosphoglucolipid V gestützt (Abbildung 13, Seite 91). In allen Streptococcenstämmen scheint der sn-Glycerin-1-phosphat-Transfer spezifisch auf C-6 der äußeren Glucose im Kojibiosyldiglycerid zu erfolgen, da wir weder ein Positionsisomer noch das Monoglucosyldiglycerid-Homologe nachweisen konnten.

Phosphoglucolipid VI schließlich, in *S. faecalis* mit Phosphoglucolipid III und V vergesellschaftet, hat

¹⁾ Dieser Spezifität zufolge wird wahrscheinlich der Phosphatidylrest auch auf Monoglucosyldiglycerid übertragen, wodurch Phosphoglucolipid I entsteht.

beide Substituenten in derselben Position wie in Phosphoglucolipid III und V. Wir vermuten daher, daß die Biosynthese durch die konzertierte Aktion der Phosphatidyl- und Glycerin-1-phosphat-Transferase erfolgt, die für die Bildung von Phosphoglucolipid III und V verantwortlich sind.

Die Tatsache, daß der Diglucosyldiglyceridanteil aus Phosphoglucolipid VI im Gegensatz zu dem aus Phosphoglucolipid III denselben niedrigen Gehalt an C₁₉-Cyclopropansäure aufweist, wie Phosphoglucolipid V, könnte dafür sprechen, daß VI aus V entsteht, d.h. der Phosphatidyl- nach dem Glycerin-phosphat-Transfer erfolgt.

Die Biosynthese der Phosphoglucolipide in *S.lactis* dürfte in ähnlicher Weise erfolgen. Phosphatidyl- und Diglucosyldiglycerid-Rest aus Phosphoglucolipid III zeigen im Core und Fettsäureverteilungsmuster wiederum Übereinstimmung mit den einfachen Phospho- und Glykolipiden (Abbildung 15, Seite 100). Obwohl Phosphoglucolipid III und V gefunden wird, fehlt Phosphoglucolipid VI, was auf eine unterschiedliche Acceptorspezifität der Phosphatidyltransferase hinweist.

Dasselbe gilt für *S.haemolyticus*. Hier wird die Phosphatidylglykolipid-Reihe (I - IV) vollständig synthetisiert. Es ist unwahrscheinlich, daß die Biosynthese von Phosphoglucolipid I ausgeht und die Reihe durch einfachen und doppelten Glucosetransfer entsteht, da Phosphoglucolipid II nicht auf diesem Weg entstehen kann. Wahrscheinlicher ist daher der direkte Phosphatidyltransfer auf Mono-, Di- und Triglucosyldiglycerid (Schema 22). Ob die einzelnen Reaktionen durch verschiedene Enzyme oder sämtlich durch eine weniger positionsspezifische Phosphatidyltransferase katalysiert werden, bleibt derzeit noch offen. Auffallend ist, daß das Fettsäure-make-up der Glucosyldiglyceride

und Phosphatidylreste in dieser Reihe recht einheitlich ist und sich von dem der Glykolipide und Phospholipide, wenn auch nicht prinzipiell, so doch deutlich unterscheidet (Abbildung 16, Seite 107). Es stellt sich somit auch in dieser Verbindungsklasse von *S. haemolyticus* das Problem, ob Spezies-Selektierung oder De- und Reacylierung hierfür verantwortlich ist. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Abbausequenzen, die eine getrennte Erfassung der Fettsäuren aus den vier Positionen ermöglichen (Schema 15, 16, 17, Seite 70, 76, 81) kann dieses Problem mit Doppelmarkierungsversuchen (^3H -Glycerin, ^{14}C -Acetat) nun experimentell angegangen werden.

VII MATERIALIEN UND METHODEN

VII.1 Materialien Kieselgel Mallinckrodt (100 mesh), Hyflo Super Cel (2-25 μ m), Dowex-Kationenaustauscher, H^+ -Form (50 W x 8, 100-200 mesh), wurden von Serva, Heidelberg, Standardgemische von Fettsäuremethylestern von Applied Sciences, Inc., U.S.A. bezogen.

Kieselgel, Kanto Kakagu der Firma Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo wurde uns dankenswerter Weise von Prof. Dr. T. Yamakawa überlassen. Von ihm erhielten wir auch eine Probe von Lactobacillinsäuremethylester, welcher von Prof. Dr. K. Hoffmann präpariert wurde.

Nitrosomethylharnstoff wurde aus dem Institut für Angewandte Chemie, Erlangen erhalten.

Chloroform, Methanol und Aceton, DAB 7 Qualität, wurden vor Gebrauch destilliert, Chloroform anschließend mit 1 % Äthanol stabilisiert. Die übrigen Chemikalien und Reagentien wurden für qualitative Analysen im Reinheitsgrad "reinst", für quantitative Analysen sowie für präparative Zwecke im Reinheitsgrad "pro analysi" von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

SE 30, DEGS und Chromosorb W AW DMCS 80/100 stammen von der Firma Hewlett Packard G.m.b.H., Böblingen.

Dr. T. Tomita danken wir für die Überlassung von Lipase aus dem Pilz *Rhizopus arrhizus delemar*. Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas, anfangs uns freundlicherweise von Prof. Dr. G.H. de Haas zur Verfügung gestellt wurde von der Firma Boehringer, Mannheim bezogen, ebenso Phospholipase A_2 aus *Crotalus terrificus terrificus*.

VII.2 Züchtung und Extraktion der Bakterien.

a) *Streptococcus faecalis* var. *faecalis*, Nr. 7064 und *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*, Nr. 20672 aus dem Institut für Hygiene und Milchwirtschaft, Kiel wurden in 18 l Kulturen in einem Fermenter der Fa. L. Eschweiler und Co., Kiel gezüchtet. Verwendet wurde ein Maximalmedium folgender Zusammensetzung: 1 % Fleischpepton, 1 % K_2HPO_4 und 0,3 % Hefeextrakt (16). Beimpft wurde mit 1-2 l einer 12 Stunden alten Vorkultur im selben Medium. Die Züchtung im Fermenter erfolgte bei 37 °C unter Rühren. Luft wurde nicht zugeführt, da *S. faecalis* Energie ausschließlich durch Gärung gewinnt (155). Temperatur, pH und optische Dichte wurden kontinuierlich gemessen und registriert. Durch automatisches Einpumpen von 2 M NaOH-Lösung wurde der pH-Wert zwischen 6,5 und 6,9 gehalten. Wenn nach Laugenzugabe der durch Milchsäurebildung bedingte Abfall des pH ausblieb und damit den Verbrauch von Glucose anzeigte, wurde Glucose, wie in Tabelle 36 zusammengestellt, mehrmals nachgegeben. Die Bakterien wurden in der stationären Phase mit einer Cepa-Durchlaufzentrifuge geerntet. Um Autolyse zu vermeiden, wurden die Kulturen vorher auf 4 °C in einem mit Glasspiralen ausgerüsteten Kryostaten abgekühlt und in der Zentrifuge auf derselben Temperatur gehalten.

Tab. 36: Züchtung von *S. faecalis* var. *faecalis* und *S. faecalis* var. *zymogenes*. Volumen des Nährmediums 18 l

STAMM	Zucht	zusätzliche Glucosezugaben nach Menge		Wachstums- dauer (Stdn.)	Bakterien- Feucht- gewicht (g)
		(Stdn.)	(g)		
<i>S. faecalis</i> var. <i>faeca-</i>	I	8,4,4	3x150	20	200
	II	5,4	2x150	13	180
	III	3,2,2	3x150	10	280
<i>S. faecalis</i> var. <i>zymoge-</i> <i>nes</i>	IV	3,2,2, 3,3	5x200	17	145

Nach der Zentrifugation wurde das Feuchtgewicht der Bakterien bestimmt (Tabelle 36) und sofort mit dem Aufschluß begonnen (siehe unten).

Zur Reinheitskontrolle wurde vor der Ernte eine Probe steril entnommen. Die Kontrolle erfolgte durch Ausstrich auf Blutagar sowie mikroskopisch nach Gramfärbung.

b) *Streptococcus haemolyticus* D-58 wurde in einem modifizierten Todd-Hewitt Medium unter Neutralisation und mehrmaliger Glucosezugabe gezüchtet (15). Die Züchtung erfolgte im Laboratorium von Prof. Dr. Tadokoro; die Lipide wurden wie unten beschrieben aus den lyophilisierten Bakterien von Dr. I. Ishizuka (Tokyo) extrahiert und uns die Lipidrohextrakte übersandt.

c) *Streptococcus lactis* wurde in dem unter (a) beschriebenen Medium von R.D. Schmid (52) bis in die stationäre Phase gezüchtet. Neutralisation wurde nicht vorgenommen.

d) Ohne Neutralisation des Mediums wuchsen auch *S. faecalis* var. *liquefaciens*, Kiel Nr. 7415, *S. lactis*, Kiel Nr. 20512, *S. lactis* NCDO 712 in dem unter (a) beschriebenen Medium.

Die Bakterien wurden unmittelbar nach der Ernte in Methanol suspendiert und mit Hilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators im Eisbad aufgeschlossen. Nach der Extraktionsmethode nach Prottey und Ballou (32) wurde die dem Methanol entsprechende Menge an Chloroform zugegeben und mit Chloroform-Methanol 1:1 (v/v) auf ein Verhältnis Extraktionsmittel zu Bakteriengewicht 5:1 (v/g) aufgefüllt. Anschließend wurden mit gleichen Mengen an Chlo-

roform-Methanol 2:1 (v/v) vier weitere Extraktions-schritte vorgenommen. Bei Extraktion 1-4 wurde die Bakterienmasse in dem organischen Lösungsmittel 24 Stunden, bei Extraktion 5 48 Stunden mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Von der bei den ersten Extraktions-schritten zu Boden gesunkenen Bakterienmasse konnten die Extrakte abgehoben werden. Bei späteren Extraktionen setzte sich das Protein an der Oberfläche ab und die darunterliegende Flüssigkeit wurde abgesaugt. Durch Filtration durch einen Büchnertrichter wurde Protein entfernt.

Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 25-30 °C zur Trockene eingengt. Anschließend wurde zur Entfernung von Nicht-Lipiden in 200 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen. Nicht lösliche Rückstände (Protein) wurden durch Behandlung mit Ultraschall von der Gefäßwand abgelöst und suspendiert. Das Gemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt, mit 50 ml 0,45 proz. Kochsalzlösung versetzt und über Nacht zur Phasentrennung bei Raumtemperatur belassen. Die Aufarbeitung der organischen Phase und die Bestimmung des Lipidgewichtes sind unter VII.3.4 beschrieben. Aufbewahrt wurden die Lipidrohextrakte gelöst in Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) bei -20 °C.

VII.3 Säulenchromatographie

VII.3.1 Säulen mit DEAE-Cellulose, Acetatform.

Entsprechend der Vorschrift von Rouser et al. (47) wurden 60 g DEAE-Cellulose (Merck; freie Base, 0,7 mval/g, Faser 20-200 μ m) in vier 250 ml Zentrifugenbechern mit je 150 ml 1 M HCl 15 Minuten gerührt. Nach Abzentrifugation wurde der Überstand abgehoben und zur Entfernung der restlichen Salzsäure die Austauschercellulose auf der Zentrifuge gewaschen, bis die Waschflüssigkeit neutral und chloridfrei war. Die in der Hydrochlorid-Form vorlie-

gende Austauschercellulose wurde in 150 ml 0,1 M Kaliumhydroxidlösung suspendiert und 15 Minuten gerührt und dadurch in die basische Form überführt. Danach wurde mit Wasser wiederum neutral gewaschen. Der vorausgehende Zyklus wurde zweimal wiederholt.

Die nach dem letzten Waschgang in basischer Form vorliegende DEAE-Cellulose wurde in 150 ml Essigsäure gerührt, wodurch sie in die Acetatform überführt wurde. Um die Dauer der anschließenden Trocknung zu verkürzen, wurde zweimal mit 150 ml Methanol gewaschen. Die so behandelte Cellulose wurde im Exsikkator unter Vakuum über KOH getrocknet.

Zur Packung einer Standardsäule wurden 20 g DEAE-Cellulose, Acetatform, in 150 ml Essigsäure aufgerührt und über Nacht belassen, um homogene Quellung zu erreichen. Größere Partikel wurden vorsichtig mit dem Glasstab zerteilt. Die Glassäule (2,5 cm äußerer Durchmesser, mit Teflonhahn, am oberen Ende mit Schliff für Kernolive oder Vorratsgefäß mit Kern versehen) wurde mit einer mit Essigsäure gewaschenen Watteschicht gedichtet. Die Cellulose-Suspension wurde in kleinen Portionen aufgebracht und jeweils bei geöffnetem Hahn unter leichtem Überdruck (N_2) homogen gepackt. Nach vollständiger Packung war die Füllhöhe etwa 20 cm. Die Säulenfüllung wurde nacheinander mit je 200 ml Methanol, Methanol-Chloroform 1:1 (v/v) und Chloroform gewaschen. Zur Überprüfung der Homogenität der Säulenpackung und zur Ermittlung des Bettvolumens wurde eine Lösung von 5 mg Azulen ($C_{10}H_8$) in 1 ml Chloroform auf die Säule gegeben und mit Chloroform (156) eluiert. Bei guter Packung wanderte der Farbstoff als scharfe Bande und sollte aus Säulen der hier beschriebenen Größe mit etwa 80 ml Chloroform eluiert werden. Bei Farbstoffdurchbrüchen oder Bettvolumina unter 60 und über 90 ml wurde die Säule erneut gepackt, wobei die Cellulose

in Chloroform suspendiert war.

Zur Beschickung der Säule wurde das Lipidgemisch in Chloroform gelöst (maximal 2 g Lipid in 10 ml Chloroform). Die Lösung wurde bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml pro Minute aufgebracht und mit weiteren 20 ml Chloroform in vier Portionen in die Säulenpackung eingewaschen. Danach wurde der Fluß über Nacht gestoppt um eine optimale Bindung der Phosphatdiester an die Austauschercellulose zu erreichen. Dadurch ließ sich die Kapazität der Säule auf das Vier- bis Fünffache gegenüber Literaturangaben (47,57) erhöhen. Bei guter Trennleistung konnten pro g DEAE-Cellulose bis zu 100 mg Rohlipid, entsprechend etwa 20 mg Phospholipid eingesetzt werden.

Die Trennung der Lipide wurde mit einem Säulendurchfluß von 2 ml pro Minute durchgeführt. Elutionsprogramme und Volumina der gesammelten Fraktionen sind im Abschnitt II, die Aufarbeitung der Fraktionen und Entfernung von Ammoniumacetat im Abschnitt VII.3.4 beschrieben. Nach der Trennung wurde die Säule für den nächsten Versuch durch Waschen mit je drei Bettvolumina Methanol, Essigsäure, Methanol, Methanol-Chloroform 1:1 (v/v) und Chloroform (47) regeneriert.

VII.3.2 Säulen mit Kieselgel

Kieselgel (Mallinckrodt, 100 mesh oder Kanto Kakagu, 100 mesh) wurde 12 Stunden bei 110 °C aktiviert, abgekühlt und als Suspension in Chloroform (47) in die Säule gegossen. Über dem Säulenausfluß befand sich eine 1 cm hohe Watteschicht, die mit Methanol, Chloroform-Methanol 2:1 (v/v), Aceton, Chloroform gewaschen worden war. Nachdem sich das Kieselgel bei laufender Säule abgesetzt hatte, wurde die Oberfläche mit Seesand (Merck, mit Säure gewaschen und geßlüt) abgedeckt. Das Lipid

wurde in Chloroform gelöst auf die Säule gegeben. Pro 1 g Kieselgel wurden 10-15 mg Lipid eingesetzt (47). Säulenmaße und Elutionsprogramme sind in Abschnitt II für die einzelnen Trennungen angegeben.

VII.3.3 Säulen mit "Na-Kieselgel". (44,52,53)

Zur Überführung von Kieselgel Mallinckrodt in die "Na-Form" wurden 72 g Kieselgel mit 36 g Hyflo Super Cel in 800 ml 2 M HCl 45 Minuten gerührt. Nach Absetzen des Kieselgels wurde der Überstand abgegossen und 800 ml 2 M Natriumhydrogencarbonatlösung in mehreren Portionen eingerührt. Nachdem die CO_2 -Entwicklung zum Stillstand gekommen war, wurde das Kieselgel auf einem Büchnertrichter (Durchmesser: 18,5 cm, Filter: Schleicher und Schüll, Nr 595), abfiltriert, und im Trichter mit 400 ml NaHCO_3 -Lösung aufgerührt und nach 5 Minuten erneut abfiltriert. Überschüssiges NaHCO_3 und restliches NaCl wurden auf dem Büchnertrichter mit CO_2 -freiem Wasser¹⁾ (44) ausgewaschen, bis das Waschwasser fast neutral und chloridfrei war. Anschließend wurde mit je 200 ml Methanol gewaschen und im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet. Bis zur Verwendung wurde das Kieselgel im Exsikkator aufbewahrt, vor Gebrauch bei 110 °C über Nacht aktiviert und wie bei VII.3.2 in die Säule gefüllt.

VII.3.4 Aufarbeitung der Fraktionen.

Säulenfraktionen, die bei der dünnschichtchromatographischen Prüfung (vgl. VII.4.2) eine ähnliche Lipidzusammensetzung aufwiesen, wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 30 °C Badtemperatur auf ein kleines Volumen eingeeengt. Um eventuell vorhandene Spuren an Säu-

1) Bidest. Wasser wurde ausgekocht. Zum Druckausgleich beim Abkühlen wurde das Gefäß mit einer mit gesättigter Ba(OH)_2 -Lösung beschickten Waschflasche verbunden, um die nachströmende Luft CO_2 -frei zu machen.

lenfüllmaterial zu entfernen und wieder einheitliche Salzformen zu erhalten wurde eine Phasenverteilung nach Folch et al. (157) durchgeführt: Hierzu wurden die Lipide mit 60 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) in einen Scheidetrichter überführt, wobei an der Wand niedergeschlagenes Kieselgel mit Ultraschall abgelöst und suspendiert wurde. In den Scheidetrichter wurden 15 ml einer wässrigen 0,45 proz. NaCl- oder 0,2 proz. BaCl_2 -Lösung (15) gegeben, dann wurde geschüttelt und über Nacht bei Raumtemperatur zur Phasentrennung belassen. Bei stark polaren Phosphoglucolipiden, wie Phosphoglucolipid V, ist BaCl_2 vorzuziehen, da das kaum dissoziierte Ba-Salz (158) des Lipids eine wesentlich geringere Wasserlöslichkeit besitzt. Nicht-Lipide bleiben in der Regel in der wässrigen Phase, Kieselgel scheidet sich an der Grenzfläche ab. Die untere lipidhaltige Phase wurde am Verdampfer zur Trockene gebracht.

Bei Fraktionen aus DEAE-Cellulose-Säulen, die Ammoniumacetat enthielten, erwies es sich als vorteilhaft, die untere Phase in einem zweiten Scheidetrichter nochmals mit der oberen Phase eines Blindansatzes gleichen Volumens nachzuwaschen.

Beim Einengen der so aufgearbeiteten Fraktionen wurde restliches Wasser mit Benzol-Methanol 1:1 (v/v), restliches Ammoniumacetat mit Methanol-Wasser 1:0,2 (v/v) entfernt. Danach war ein Trocknungsgrad erreicht, der kontrolliert an der Gewichtskonstanz, eine Ermittlung des Fraktionsgewichts ermöglichte.

Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Lipide in Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) bei -20°C aufbewahrt.

VII.4 Dünnschichtchromatographie

VII.4.1 Präparative Dünnschichtchromatographie

Kieselgelplatten (Merck) wurden vor Gebrauch mit Chloroform-Methanol-Wasser 65:35:8 (p. Vol.) vorchromatographiert, luftgetrocknet und eine Stunde bei 110 °C aktiviert. Pro Platte wurden etwa 10 mg Lipid, bei schwierigen Trennungen entsprechend weniger eingesetzt. Die Bandenauftragung des zu trennenden Gemisches erfolgte in Chloroform mit einer Mikroliterspritze. Zur Ortung der Verbindungen wurden am Rande authentische Vergleichssubstanzen mitchromatographiert. Die verwendeten Fließmittel sind in den entsprechenden Abschnitten (vgl. Seite 149, 155, 157, 159 und Tabelle 37, Seite 159 sowie Tabelle 38, Seite 161) aufgeführt. Nach Entwicklung des Chromatogramms wurde unter kaltem Föhn getrocknet. Danach wurde der Bereich der Bandenauftragung über die ganze Plattenhöhe mit einer Glasplatte so abgedeckt, daß je 0,5 cm der jeweiligen Bandenenden beiderseits unabgedeckt blieben. Nach Fixierung der Platte mit Tesafilm wurde mit Joddampf angefärbt, wobei der abgedeckte, zur Isolierung bestimmte Anteil der Banden völlig jodfrei blieb. Meist konnten die Banden auf diese Weise lokalisiert werden. Nach ihrer Markierung mittels Bleistift wurde zur Kontrolle des Bandenverlaufs die Platte im durchscheinenden Licht betrachtet oder mit Wasser besprüht. Dabei erschienen die meisten Lipide opak auf durchscheinendem Untergrund. Die mit Wasser angefeuchteten Banden wurden ausgekratzt. Das Kieselgel wurde in verschraubbare Zentrifugengläser (Sovirel) überführt und mit je 10 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v), 1:1 (v/v), 1:2 (v/v) und mit Chloroform-Methanol-Wasser-Essigsäure 65:35:8:0,1 (p. Vol.) nacheinander extrahiert. Für die Extraktion wurde jeweils 15 Minuten mit dem Magnetrührer gerührt und anschließend bei 3000 U/min (Heraeus-Christ, Zentrifuge U J III E) zentrifugiert.

Die Extrakte wurden vereinigt. Zur Entfernung des restlichen Kieselgels wurden sie unmittelbar einer Folch-

Verteilung unterworfen, indem im Scheidetrichter mit Chloroform und Wasser oder einer 0,45 proz. NaCl-Lösung auf die im Abschnitt VII.3.4 gegebenen Volumenverhältnisse ergänzt wurde.

VII.4.2 Analytische Dünnschichtchromatographie.

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde eingesetzt:

- (i) zur Identifizierung der Lipide in den Lipidrohextrakten (vgl. Abbildung 2-5, Seite 12 und 14-16).
- (ii) zur Prüfung der Lipidzusammensetzung einzelner Fraktionen nach Trennungen (vgl. Abbildung 6, 8, 9, Seite 18, 23, 29).
- (iii) zur Reinheitsprüfung der isolierten Verbindungen.

Bei (i) und (iii) wurde zweidimensional, bei (ii) in der Regel eindimensional jeweils bei Kammerfüllung chromatographiert. Von Rohextrakten wurde etwa 1 mg, von Einzellipiden ca. 20 nmol aus Chloroform-Methanol-Lösungen aufgetragen.

Fließmittel:

1. neutral

Chloroform-Methanol-Wasser

- a) 65:35:8 (p.Vol.)
- b) 65:25:4 (p.Vol.) (159)
- c) 70:20:2 (p.Vol.)

2. sauer

Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser

- a) 50:20:10:10:5 (p.Vol.) (47)
- b) 60:30:10:10:2,5 (p.Vol.)

3. alkalisch

Chloroform-Methanol-25 proz. Ammoniak-Wasser

- a) 65:35:4:4 (p.Vol.) (47)
- b) 65:25:2:2 (p.Vol.)

Für (i) und (iii) wurde in der ersten Dimension ein neutrales oder alkalisches Fließmittel, in der zweiten

Dimension ein saures verwendet. Nach der ersten Trennung wurde das Fließmittel unter dem kalten Föhn entfernt.

Die einzelnen Lipide wurden mit den in Tabelle 2, Seite 13 aufgeführten Färbereagenzien sichtbar gemacht. In der Regel wurden zwei Chromatogramme angefertigt, auf denen zunächst alle Lipide mit Joddampf (34) sichtbar gemacht wurden. Von jeder Platte wurde eine Xerokopie oder Photographie angefertigt. Nach Abdampfen des Jods bei 110°C (5 Minuten), wurde die eine Platte mit α -Naphthol-Schwefelsäure (35) besprüht und zur Färbung der kohlenhydrathaltigen Lipide ca. 5 Minuten bei 110°C erhitzt. Auf der zweiten Platte wurden amingruppenhaltige Lipide durch Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz (37) und anschließender Entwicklung bei 110°C über wenige Minuten selektiv gefärbt. Nach Einzeichnen der positiven Flecken wurde die erkaltete Platte auf Phospholipide und Phosphoglucolipide nach dem Reagenz nach Dittmer und Lester (36) gefärbt, wobei jedoch zur Erhöhung der Empfindlichkeit das Reagenz mit gleichen Anteilen an Äthanol versetzt wurde (160).

Um bei Säulenchromatographie die Trennung rasch verfolgen zu können, wurde in histologischen Trennkammern auf Kieselgelfolien (Merck), zugeschnitten auf ein Format $2,5 \times 5 \text{ cm}$ mit einer Entwicklungsdauer von 5-10 Minuten chromatographiert. Hierzu wurden 1-5 % einer Fraktion zur Trockene gebracht und nach Aufnahme in $50 \mu\text{l}$ Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) vollständig aufgetragen. Bei ammoniumacetathaltigen Fraktionen wurde das Aliquot mit 25 % seines Volumens an Wasser versetzt und gründlich durchmischt. Nach Zentrifugation wurde die Ammoniumacetat enthaltende obere Phase entfernt.

Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten Lipide mit zweidimensionaler DC wurde zusätzlich mit einem Veraschungsreagenz ($20 \text{ g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $4 \text{ ml konz. H}_2\text{SO}_4$ in

100 ml Wasser, Entwicklung: Erhitzen der Dünnschichtplatte auf 160-180 °C auf einer Leichtmetallplatte), auf sonst nicht faßbare organische Verunreinigungen geprüft (57).

VII.5 Gaschromatographie.

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Fettsäuremethylester wurden zwei Trennsysteme gewählt.

- (i) apolar: 2 % SE 30 auf Chromosorb W AW DMCS 80/100
- (ii) polar: 10 % DEGS auf Chromosorb W AW DMCS 80/100

Gaschromatographiert wurde mit einem Gerät von Hewlett Packard, 5750 B, mit Flammenionisationsdetektor. Für die Analysen wurden Glassäulen der Länge 1,80-2,10 m und einem Innendurchmesser von 3 mm verwendet. Trägergas war Stickstoff mit einem Vordruck von 1,5-1,8 atü. Vor jedem Arbeitsprogramm mit dem Gerät wurde mit Probegemischen von Fettsäuremethylestern das optimale Trennprogramm ermittelt. Die Trägergasgeschwindigkeit wurde am Strömungsmesser (Rotameter) eingestellt. Sie entsprach bei einer Anzeige von 1,2-1,5 25-35 ml/min. Sie wurde mit einem Seifenblasenströmungsmesser bestimmt, den man im Detektor an das ausströmende Trägergas anschloß.

Die Analysen wurden bei programmierter Ofentemperatur gefahren, wobei im Bereich von 150-210 °C mit 4 °C/min bei polarer Säule, mit 2 °C/min bei apolarer Säule aufgeheizt wurde.

Für jede quantitative Analyse wurden vier Trennläufe gemacht und die nach Abschnitt III.2 erhaltenen Werte gemittelt.

Die durch milde Alkalihydrolyse aus den Lipiden und den Lipidabbauprodukten freigesetzten (VII.6.1) oder durch Enzyme abgespaltenen Fettsäuren (VII.7.1 und VII.7.2) wurden wie folgt methyliert. Zunächst wurde das organische Lösungsmittel (Chloroform-Methanol) am Rotationsverdamp-

fer entfernt. Bei Anwesenheit von Wasser wurde mit Benzol, bei Vorhandensein von Essigsäure mit Tetrachlorkohlenstoff mehrmals abgezogen. Die Lösungsmittel selbst wurden dann durch Abziehen mit Diäthyläther (1 ml) entfernt. Zur Methylierung wurde 1 ml einer ätherischen Diazomethanolösung (über KOH getrocknet) zugesetzt. Überschuß an Reagenz wurde an der bleibenden Gelbfärbung kontrolliert. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln belassen (54), dann wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ohne Wasserbad entfernt. Zur Chromatographie wurde in einem geeigneten Volumen Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen.

Die Lösung von Diazomethan in Diäthyläther wurde aus Nitrosomethylharnstoff hergestellt (161).

Der für alle oben aufgeführten Schritte verwendete Diäthyläther wurde unmittelbar vor Gebrauch über eine mit Aluminiumoxid (basisch, Aktivitätsstufe I, Woelm) gefüllte Säule von als Stabilisator zugesetztem 2,6-Di-tert.-butyl-p-kresol befreit, da dieses methyliert (162) bei Gaschromatographie auf der polaren Säule die gleiche Retentionszeit wie Tetradecansäuremethylester aufweist.

VII.6 Chemische Spaltungen

VII.6.1 Desacylierung der Lipide zur Darstellung der Fettsäuren.

Desacylierung erfolgte durch milde alkalische Hydrolyse: 1 μ Mol Lipid wurde in 1 ml Chloroform gelöst und mit 0,25 ml 0,4 M methanolischer NaOH-Lösung ¹⁾ versetzt. Der gut durchmischte Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtempera-

1) Hergestellt aus 4 M wässriger NaOH-Lösung durch Verdünnen mit Methanol

tur belassen (163). Danach wurden je 1 ml Chloroform und Wasser zugesetzt, gemischt, im wässrigen Überstand das pH kontrolliert und dann so lange Dowex 50 W x 8, H⁺ Form (100-200 mesh)¹⁾ zugesetzt, bis die wässrige Phase sauer reagierte. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgehoben, zum Restansatz Methanol gegeben, bis der Austauscher sich abzentrifugieren ließ. Der Überstand wurde in einen Scheidetrichter überführt, der Austauscher mit Chloroform-Methanol 1:2 (v/v) nachgewaschen, der Überstand wieder in den Scheidetrichter gegeben, in welchem die Fettsäuren nach Zugabe von 20 ml Chloroform und 10 ml Wasser ausgeschüttelt wurden. Die weitere Aufarbeitung der organischen Phase ist im Abschnitt VII.5 beschrieben.

Spaltprodukte, welche nach chemischem und enzymatischem Abbau der Ausgangslipide (VII.6.2, 6.3 und VII.7) dünn-schichtchromatographisch isoliert worden waren, wurden in derselben Weise zur Fettsäureanalyse desacyliert. Nach der in VII.4.1 beschriebenen Extraktion aus dem Kieselgel wurde ohne Folch-Verteilung unmittelbar am Rotationsverdampfer zur Trockene gegangen und Wasser sowie Essigsäure durch mehrmaliges Abziehen mit Benzol-Tetrachlorkohlenstoff entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, das an der Wand abgeschiedene Kieselgel mit Ultraschall suspendiert. Der Desacylierungsansatz wurde gegenüber oben verdoppelt, um in Anwesenheit von Kieselgel ein ausreichend alkalisches Milieu zu erhalten.

1) Der Austauscher war wie folgt vorbehandelt: Er wurde zunächst nacheinander mit 2 M HCl, Wasser, 0,4 proz. NaOH-Lösung, 2 M HCl und erneut mit Wasser gewaschen, wobei zur Entfernung besonders feiner Partikel der jeweilige Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Danach wurde mit Methanol, Chloroform-Methanol 2:1 (v/v), Methanol, Wasser gewaschen und der so behandelte Austauscher in Wasser aufbewahrt. Verfärbung des Überstandes zeigte die Notwendigkeit einer Wiederholung der Vorbehandlung an.

Die beschriebene Desacylierung wurde auch zur Gewinnung des intakten "Core" benutzt, da unter den milden alkalischen Reaktionsbedingungen keine Spaltung der Phosphodiester stattfand (18). In solchen Fällen wurde die nach Desacylierung erhaltene Wasserphase zur Entfernung des Austauschers durch eine Glasfritte (D 4) gesaugt und anschließend mit Ammoniak neutralisiert.

VII.6.2 Phosphodiestererspaltung in Phosphoglucolipiden mit 60 proz. HF.¹⁾

Der Abbau beruht auf der Methode von Toon et al. (10), die damit Lipoteichonsäure aus *S. faecalis* spalteten (vgl. Seite 68). 0,5-1 μ Mol Phosphoglucolipid wurden, in 1 ml Chloroform gelöst, in ein mit Kappenverschluß versehenes zylindrisches Polyäthylengefäß von 1,5 cm Durchmesser gebracht und durch Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuumexsikkator als feiner Film auf den Boden und die unteren Wandpartien aufgezogen. Dann wurde 1 ml einer 60 proz. (g/v) HF-Lösung, die auf -20°C vorgekühlt war, zugegeben und das Reaktionsgemisch 18-36 Stunden bei $0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ belassen.

a) Neutralisation der Flußsäure mit LiOH (10)

Zur Beendigung der Reaktion wurde mit Lithiumhydroxid bei $+4^{\circ}\text{C}$ neutralisiert: Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde unter zweimaligem Nachwaschen mit 2 ml Wasser in eine bei $+4^{\circ}\text{C}$ vorgekühlte gesättigte Lithiumhydroxid-Lösung unter kräftigen Durchmischen gebracht. Das vorgelegte Lithiumhydroxid war so bemessen, daß 90 % der Flußsäure neutralisiert wurden. Im Eisbad wurde

1) Anfänglich wurde 60 proz. (g/v) HF durch Einleiten von HF in Wasser hergestellt und die Konzentration durch Titration kontrolliert. Später wurde 48 proz. (g/g) Flußsäure (Merck, p.a., $d=1,16$) verwendet, was etwa 55,6 proz. (g/v) entspricht, Unterschiede in der Reaktivität wurden nicht gefunden.

mit 1 M und 0,1 M LiOH-Lösung das pH mittels Glaselektrode auf 6,5 eingestellt. Nach Gefriertrocknung wurde das Lithiumfluorid je zweimal mit 10 ml Wasser, dann mit je 10 ml Chloroform-Methanol 1:2, 1:1 und 2:1 (v/v) extrahiert, wobei nach jedem Schritt zentrifugiert und die jeweiligen Überstände in einen Scheidetrichter überführt wurden. Danach wurden Chloroform und Methanol zugesetzt, um die für eine Verteilung nach Folch et al. notwendigen Volumenverhältnisse zu erhalten. Die obere Phase enthielt wasserlösliche, die untere Lipid-Spaltprodukte. Die Aufarbeitung der organischen Phase erfolgte wie bei VII.3.4 beschrieben.

b) Neutralisation mit Ammoniumhydrogencarbonat (modifiziert nach l.c. 73)

Dieses raschere Verfahren wurde verwendet, wenn auf die Isolierung der wasserlöslichen Spaltprodukte verzichtet wurde. Der HF-Reaktionsansatz wurde hier in ein in einem Scheidetrichter befindliches auf 0 °C vorgekühltes Gemisch von 100 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) und 25 ml Wasser gegossen und das Reaktionsgefäß zweimal mit je 1 ml einer vorgekühlten Chloroform-Methanol-Mischung 2:1 (v/v) nachgespült. Dann wurde Ammoniumhydrogencarbonat in Substanz portionsweise unter Umschwenken zugegeben, bis die aufhörende Gasentwicklung die Neutralisation der Flußsäure anzeigte. Nach der Trennung beider Phasen wurde die organische Phase mit der wässrigen Phase eines Folch-Blindansatzes (100 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v), 25 ml 0,45 proz. NaCl-Lösung) ausgeschüttelt und dann wie bei VII.3.4 aufgearbeitet.

Die erhaltenen Lipid-Spaltprodukte wurden anschließend durch präparative Dünnschichtchromatographie getrennt. Die verwendeten Fließmittel waren:

- a) Petroleumbenzin (Kp 60-80 °C)-Diäthyläther-Essigsäure 50:50:4 (p.Vol.) für Diglyceride,

- b) Chloroform-Methanol-Wasser 70:20:2 (p.Vol.) für Monoglucosyldiglycerid und intakt gebliebenes Phosphoglucolipid I,
- c) Chloroform-Methanol-Aceton-Essigsäure-Wasser 50:10:20:10:5 (p. Vol.) für Diglucosyldiglycerid und intakt gebliebenes Phosphoglucolipid II, III und VI sowie Isolierung von Diglucosyldiglycerid aus Phosphoglucolipid V.

Die weiteren Aufarbeitungsschritte sind bei VII.4.1 und VII.5 beschrieben.

VII.6.3 Phosphodieterspaltung in Phosphoglucolipiden mit 98 proz. Essigsäure.

Phosphoglucolipid V und Acylphosphatidylglycerin wurden als solche eingesetzt, Phosphoglucolipid I-IV, sowie VI nach Freilegung der OH-Gruppen in Position 2 des Phosphatidylanteiles mit Phospholipase A₂. Im letzteren Fall waren freigesetzte Fettsäuren und Lysoverbindungen vor dem Essigsäureabbau dünnschichtchromatographisch isoliert worden (VII.7.2).

1-2 μ Mol Lipid, in Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) gelöst, wurden in mit Schraubverschluß versehenen Reagenzgläsern (Sovirel) am Rotationsverdampfer bei 30 °C Badtemperatur zur Trockene gebracht. Dann wurde 1 ml 98 proz. (v/v) Essigsäure zugesetzt, kurz mit Ultraschall behandelt und unter Verschluß im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Reaktionsdauer betrug 30 Minuten mit Ausnahme von Lysophosphoglucolipid VI, das 45 Minuten erhitzt wurde.

Nach Abkühlen wurde die Essigsäure am Rotationsverdampfer unter Zugabe von Tetrachlorkohlenstoff entfernt. Die Lipid-Spaltprodukte wurden direkt zur präparativen Dünnschichtchromatographie in Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen.

Fließmittel:

- a) Chloroform-Methanol-Wasser 70:20:2 (p.Vol.)
für Monoglucosyldiglycerid und Lysophosphatidsäure
aus Phosphoglucolipid I, für Diglycerid und Lysophosphatidsäure aus Acylphosphatidylglycerin.
- b) Chloroform-Methanol-Wasser 65:35:8 (p.Vol.) für Diglucosyldiglycerid und Lysophosphatidsäure aus Phosphoglucolipid II, III, IV und VI (vgl. Abbildung 12, Seite 77).
- c) Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser 50:20:10:10:5 (p.Vol.) für Diglucosyldiglycerid aus Phosphoglucolipid V.

Weiteres Vorgehen: entsprechend VII.5

VII.6.4 Desacylierung und Phosphodiestererspaltung in 0,1 M NaOH bei 100 °C.

Dieses Verfahren wurde benötigt, um in den Säulenfraktionen Phosphoglucolipid IV von Lysophosphoglucolipid II und III unterscheiden zu können (vgl. Seite 43). Ersteres liefert bei diesem Abbau Triglucoylglycerin, die beiden letzteren Diglucoylglycerin, während der Phosphatidylanteil der Ausgangsverbindung vorwiegend in Form von α - und β -Glycerinphosphat freigesetzt wird (17). Triglucoylglycerin und Diglucoylglycerin sind dabei leicht unterscheidbar.

Die zu prüfenden Säuleneluate waren zunächst in Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) gelöst. Aliquote Volumina, enthaltend etwa 0,2 mg Lipid, wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Dann wurde 0,5 ml 0,1 M NaOH zugesetzt und gründlich gemischt. Die beschickten Gefäße wurden in ein dafür angefertigtes Metallgestell eingesetzt, wobei die Deckel der Reaktionsgefäße durch eine mit Schrauben fixierbare Deckplatte fest aufgedrückt wurden, was auch bei 100 °C einen absolut dichten Verschuß gewährleistete.

Hydrolysiert wurde 24 Stunden bei 100 °C. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch zur Entfernung von Na^+ durch eine abgeschnittene Pasteurpipette gegeben, die am Auslauf mit silanisierter Glaswolle gedichtet und etwa 1 cm hoch mit Dowex 50 W x 8, NH_4^+ -Form gefüllt war. Anschließend wurde mit Wasser nachgewaschen, das Gesamteluat im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und der Rückstand zur Chromatographie in 60 proz. Methanol aufgenommen.

Chromatographiert wurde auf Kieselgel-Fertigplatten (Merck) mit Pyridin-Propan-1-ol-Wasser 7:4:3 (p. Vol.) (22). Gefärbt wurde nach Abdampfen des Pyridins unter heißem Föhn mit α -Naphthol-Schwefelsäure. Als Vergleichssubstanzen dienten Mono-, Di- und Triglycosyldiglycerin.

VII.7 Enzymatische Spaltungen

VII.7.1 Abbau der Glucolipide mit Rhizopuslipase.

1-2 μMol Lipid wurden am Rotationsverdampfer mit 1 ml einer Lösung von 4 mg Triton-X-100 in Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) zur Trockene gezogen. Zur vollständigen Entfernung von Chloroform wurde mit Methanol nochmals zur Trockene gegangen. Nach Zusatz von 1 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,4 0,04 M) wurde im Wasserbad bei 100 °C 2-3 Minuten erhitzt. Falls nach Abkühlen auf Raumtemperatur keine klare micellare Lösung erhalten wurde, wurde mit Ultraschall nachbehandelt. Danach wurde das Enzym in Substanz in den Ansatz gegeben. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur, wobei alle 30 Minuten umgeschüttelt wurde. Die für die einzelnen Lipide notwendigen Enzymkonzentrationen und erforderlichen Reaktionszeiten sind in Tabelle 6, Seite 58 gegeben.

Tab. 37: Dünnschichtchromatographische Trennbarkeit von intakt gebliebenen Glucolipiden und ihren nach Spaltung mit Rhizopuslipase entstandenen Lysoverbindungen. Fließmittel: a) Chloroform-Methanol-Wasser 70:20:2 (p. Vol.), b) Chloroform-Methanol-Wasser 65:35:8 (p. Vol.), c) Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser 60:30:10:10:3 (p. Vol.), d) Chloroform-Aceton-Methanol-Essigsäure-Wasser 50:20:10:10:5 (p. Vol.).

VERBINDUNG	Fließmittel	intaktes Lipid	Lyso- verbindung	
		R _F	R _F	R _{intakt}
Monoglucosyldiglycerid	a)	0,66	0,34	0,52
N-Acetylglucosaminyldi- glycerid	c)	0,72	0,33	0,47
Diglucosyldiglycerid	b)	0,60	0,40	0,67
	d)	0,78	0,50	0,64
Triglucosyldiglycerid	b)	0,50	0,35	0,70

Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit einigen Tropfen Essigsäure gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz zur Entfernung von Puffer und Protein mit 60 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v), 15 ml NaCl (0,45 %) und 0,1 ml Essigsäure ausgeschüttelt. Die abgespaltenen Fettsäuren gehen dabei vollständig in die organische Phase über. Die Aufarbeitung der organischen Phase erfolgte wie bei VII.3.4

Die Trennung von freigesetzten Fettsäuren, Triton-X-100, Lysoverbindung und intakt gebliebenem Lipid erfolgte präparativ auf ein und derselben Platte. Zuerst wurde mit Petroleumbenzin (Kp 60-80 °C)-Diäthyläther-Essigsäure 50:50:4 (p.Vol.) entwickelt, wobei die Fettsäuren ins obere Drittel der Platte stiegen und die übrigen Substanzen im Start blieben. Nach Sichtbarmachung und Auskratzen der Fettsäurebande (VII.4.1) wurde mit einem

polaren Fließmittel chromatographiert: Triton-X-100 liegt dabei frontnah, intaktes Lipid und Lysoverbindung sind leicht trennbar und zeigen das in Tabelle 37 zusammenge stellte chromatographische Verhalten.

Sichtbarmachung der Banden und Elution des Kieselgels erfolgte wie bei VII.4.1 beschrieben. Nach Auskratzen der Banden wurde zur Kontrolle der vollständigen Erfassung die ganze Platte mit α -Naphthol-Schwefelsäure gefärbt.

VII.7.2 Abbau von Phospholipiden und Phosphoglucolipiden mit Phospholipase A₂.

Die für die einzelnen Phospho- und Phosphoglucolipide erforderlichen Enzymkonzentrationen sind in Tabelle 12, Seite 65 zusammengestellt.

a) Ansatz für Spaltung mit Phospholipase A₂ aus *Crotalus terrificus terrificus*:

1-2 μ Mol Lipid wurden in 0,4 ml Diäthyläther gelöst, mit 0,75 ml 0,05 M Collidin-HCl-Puffer, pH 7,4, enthaltend 10 mM CaCl₂, und der notwendigen Enzymmenge versetzt.

b) Ansatz für Spaltung mit Phospholipase A₂ aus Schweinepankreas:

Der Ansatz bestand aus 1-2 μ Mol Lipid in 0,5 ml Diäthyläther gelöst, 0,5 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,3, enthaltend 30 mM CaCl₂ und der erforderlichen Enzymmenge.

Während der Inkubation wurden die Ansätze zur Durchmischung der beiden Phasen wiederholt geschüttelt. Der Stop der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Essigsäure. Anschließend wurde das Enzym durch Phasenverteilung mit 60 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) und 15 ml wässriger 1 M CaCl₂-Lösung abgetrennt. CaCl₂ erwies sich als zweckmäßig, da hierdurch Phospholipide einheitlich in das Calciumsalz überführt werden (158) und dann bei Chromatographie in neutralen Systemen als einheitliche Bande wandern. Bei

Tab. 38: Dünnschichtchromatographische Trennbarkeit der Phosphoglucolipide und Phospholipide und ihrer nach Behandlung mit Phospholipase A₂ erhaltenen Lysoverbindungen.

R_{intakt}: Wanderungsstrecke der Lysoverbindungen bezogen auf die Wanderungsstrecken der jeweiligen Ausgangsverbindungen.

R_{DGDG}: Steighöhen bezogen auf die Steighöhe von Diglucosyldiglycerid (α -Kojibiosyldiglycerid).

Kieselgel-Fertigplatten (Merck), bei 1) auf Kieselgel-Fertigplatten (Woelm). Fließmittel: a) Chloroform-Aceton-Methanol-Wasser 50:20:10:10:5 (p.Vol.), b) Chloroform-Methanol-Wasser 65:35:8 (p.Vol.), c) Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 (p.Vol.).

VERBINDUNG	Fließmittel	Lipid intakt		Lyso-Verbindung		
		R _F	R _{DGDG}	R _F	R _{DGDG}	R _{intakt}
Phosphatidyl-glycerin	a	0,58	-	0,34	-	0,59
	b	0,85	-	0,32	-	0,38
Acylphosphatidyl-glycerin	c	0,62	-	0,44	-	0,71
Cardiolipin	a	0,52	-	0,25	-	0,48
				0,05	-	0,10
	b	0,56	-	0,29	-	0,52
				0,15	-	0,27
Phosphoglucolipid I	a	-	1,73	-	1,00	0,62
Phosphoglucolipid II	a	-	1,14	-	0,60	0,53
Phosphoglucolipid III	a	-	0,86	-	0,40	0,47
Phosphoglucolipid VI	c ¹⁾	0,45	-	0,36	-	0,80

Von den beiden für die Lysoverbindung von Cardiolipin gegebenen Werten entspricht jeweils der größere dem Mono-, der kleinere dem Didesacylderivat.

Verwendung von NaCl traten Doppelbanden auf. Die Puffersubstanzen gehen zum Teil in die organische Phase über, stören aber bei der anschließenden Trennung nicht. Die präparative Trennung von Fettsäuren, Lysoverbindung, intaktem Lipid und Puffersubstanz erfolgte auch hier jeweils auf einer Platte. Die Fettsäuren wurden wie im vorausgehenden Abschnitt beschrieben mit wenig polarem Fließmittel abgetrennt und ausgekratzt. Dann wurde polar entwickelt, wobei die Puffersubstanzen frontnah zu liegen kamen. Über die Trennbarkeit von intakt gebliebenen Lipiden und ihren Lysoverbindungen sowie über die hierzu verwendeten Fließmittel gibt Tabelle 38 Aufschluß. Von Cardiolipin wurde das Didesacylderivat zur Fettsäureanalyse verwendet.

Sichtbarmachung und Elution erfolgte wie bei VII.4.1 beschrieben. Nach Auskratzen der Banden wurde die ganze Platte zur Kontrolle mit dem Sprühreagenz auf Phospholipide nachgefärbt.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Shaw, N. und Baddiley, J. (1968) Nature 217, 142-144
- 2) Shaw, N. (1970) Bacteriol. Rev. 34, 365-377
- 3) Goldfine, H. (1972) Advanc. Microbiol. Physiol. 8, 1-58
- 4) Vorbeck, M.L. und Marinetti, G.V. (1965) Biochemistry 4, 296-305
- 5) Cohen, M. und Panos, C. (1966) Biochemistry 5, 2385-2392
- 6) Ward, J.B. und Perkins, H.R. (1968) Biochem. J. 106, 391-400
- 7) Bishop, D.G., Rutberg, L. und Samuelson, B. (1967) Europ. J. Biochem. 2, 448-453
- 8) Minnikin, D.E., Abdolrahimzadeh, H. und Baddiley, J. (1971) Biochem. J. 124, 447-448
- 9) Minnikin, D.E., Abdolrahimzadeh, H. und Baddiley, J. (1974) Nature 249, 268-269
- 10) Toon, P., Brown, P.E. und Baddiley, J. (1972) Biochem. J. 127, 399-409
- 11) Knox, K.W. und Wicken, A.J. (1973) Bacteriol. Rev. 37, 215-217
- 12) Pieringer, R.A. und Ganfield, M.-C. (1974) Fed. Proc. 33, 1296
- 13) Wicken, A.J. und Knox, W. (1975) Science 187, 1161-1167
- 14) Powell, D.A., Duckworth, M. und Baddiley, J. (1975) Biochem. J. 151, 387-397
- 15) Ishizuka, J. und Yamakawa, T. (1968) J. Biochem. 64, 13-23
- 16) Fischer, W. und Seyferth, W. (1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349 1662-1672
- 17) Fischer, W. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 731-736
- 18) Fischer, W., Ishizuka, J., Landgraf, H.R. und Herrmann, J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 296, 527-545
- 19) Fischer, W., Landgraf, H.R. und Herrmann, J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 306, 353-367

- 20) Fischer, W. und Landgraf, H.R. (1975) Biochim. Biophys. Acta 380, 227-244
- 21) Fischer, W. (1976) Newly discovered lipids from streptococci. In Lipids, Band I: Biochemistry, S. 255-266 (Paoletti, R. assoc. Porcelatti, R. edit.), Raven Press, New York
- 22) Fischer, W. unveröffentlicht
- 23) Wilkinson, S.G. und Bell, M.E. (1971) Biochim. Biophys. Acta 248, 293-299
- 24) Shaw, N. und Stead, A. (1972) FEBS-Letters 21, 249-253
- 25) Shaw, N., Smith, P.F. und Verheij, H.M., (1972) Biochem. J. 129, 167-173
- 26) Smith, P.F. (1972) Biochim. Biophys. Acta 280, 375-382
- 27) Komaratat, P. und Kates, M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 398, 464-484
- 28) Ambron, R.T. und Pieringer, R.A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4216-4225
- 29) Pieringer, R.A. und Ganfield, M.-C. (1975) Lipids 10, 421-426
- 30) Pieringer, R.A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 502-509
- 31) Van Deenen, L.L.M. (1965) in Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids (Holman, R.T. edit.), S. 1-127 Pergamon Press, Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris
- 32) Prottey, C. und Ballou, C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6196-6201
- 33) Ibott, F.A. und Abrams, A. (1964) Biochemistry 3, 2008-2012
- 34) Sims, R.P.A. und Larose, J.A.G. (1962) J. Am. Oil Chemists Soc. 39, 232
- 35) Krebs, K.G., Heusser, D. und Wimmer, H. (1967) in Dünnschichtchromatographie (Stahl, E. edit.), 2. Auflage, S. 813-861, Springer-Verlag, Berlin
- 36) Dittmer, J.D. und Lester, R.L. (1964) J. Lipid Res. 5, 126
- 37) Marinetti, G.V. (1962) J. Lipid Res. 3, 1-20
- 38) Shaw, N. (1968) Biochim. Biophys. Acta 164, 435-438

- 39) Olson, R.W. und Ballou, C.E. (1971) J.Biol. Chem. 246, 3305-3313
- 40) Rouser, G., Bauman, A.J., Kritchevsky, G., Heller, D. und O'Brien, J.S. (1961) J. Am. Oil Chemists' Soc. 38, 544-555
- 41) Rouser, G., Kritchevsky, G., Heller, D. und Lieber, E. (1963) J. Am. Oil Chemists' Soc. 40, 425-454
- 42) Rathbone, L. (1962) Biochem. J. 85, 461-466
- 43) Vorbeck, M.L. und Marinetti, G.V. (1965) J. Lipid Res. 6, 3-6
- 44) Rathbone, G. und Maroney, P.M. (1963) Nature 200, 887-888
- 45) Shimojo, T., Kanoh, H. und Ohno, K. (1971) J. Biochem. 69, 255-263
- 46) Rouser, G. (1973) J. Chrom. Science 11, 60-67
- 47) Rouser, G., Kritchevsky, G. und Yamamoto, A. (1967) in Lipid Chromatographic Analysis (Marinetti, G.V. edit.), Marcel Dekker, Inc., New York, S. 99-162
- 48) Brundish, D.E., Shaw, N. und Baddiley, J. (1965) Biochem. J. 97, 158-165
- 49) Hendrickson, H.S. und Ballou, C.E. (1964) J. Biol. Chem. 239, 1369-1373
- 50) Ishizuka, I. und Yamakawa, T. (1969) Jap. J. Exp. Med. 39, 321-325
- 51) Fischer, W. und Schmid, R.D. (1970) 7th Int. Symp. Chem. Nat. Prod., Riga, Abstr. C 21 (Kolosov, M.N. ed.) S. 314-316, Zinatne, Riga
- 52) Schmid, R.D., Dissertation, Erlangen (1970)
- 53) Okuyama, H. und Nojima, S. (1965) J. Biochem. 57, 529-538
- 54) James, A.T. (1960) Methods Biochem. Anal. 8, 1-59
- 55) Vorbeck, M.L., Mattick, A.L. und Pederson, C.S. (1961) Analyt. Chem. 33, 1512-1514
- 56) Ackman, R.G. in Methods in Enzymology (1969) (Lowenstein, J.M. edit.) Band XIV, S. 329-381, Academic Press, New York und London
- 57) Kates, M. (1972) Techniques of Lipidology, in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Work, T.S. und Work, E. edit.) S. 269-610, North-

Holland Publishing Company, Amsterdam und American
Elsevier Publishing Co., Inc., New York

- 58) Brain, B.L. und Gardner, E.W. (1968) *App. Microbiol.* 16, 549-552
- 59) Minnikin, D.E. (1972) *Lipids* 7, 398-403
- 60) Sastry, P.S. und Kates, M. (1964) *Biochemistry* 3, 1280-1287
- 61) Fischer, W., Heinz, E. und Zeus, M. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1115-1123
- 62) Semeriva, M., Benzonana, G. und Desnuelle, P. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49, 71-79
- 63) Slootboom, A.J., de Haas, G.H., Bonson, P.P.M., Burbach-Westerhuis, G.J. und van Deenen, L.L.M. (1970) *Chem. Phys. Lipids* 4, 15-29
- 64) Tulloch, A.P., Heinz, E. und Fischer, W. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 879-889
- 65) Semeriva, M. und Dafour, C. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 260, 393-400
- 66) Ailhaud, G., Samuel, D., Lazdunski, M. und Desnuelle, P. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 84, 643-664
- 67) Heisig, O.M.R.A. und Heinz, E. (1971) *Phytochemistry* 11, 815-818
- 68) McMurray, W.C. und Magee, W.L. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41, 129-160
- 69) Van den Bosch, H., van Golde, L.M.G. und van Deenen, L.L.M. (1972) *Erg. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.* 66, 13-145
- 70) Ono, Y. und White, D.C. (1970) *J. Bacteriol.* 104, 712-718
- 71) Neumann, W.P. und Habermann, E. (1955) *Biochem. Z.* 327, 170-185
- 72) De Haas, G.H., Postema, N.M., Nieuwenhuizen, W. und van Deenen, L.L.M. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 159, 103-117
- 73) Shaw, N. und Stead, A. (1974) *Biochem. J.* 143, 461-464
- 74) Coulon-Morelec, M.J. und Douce, R. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1547-1559

- 75) Coulon-Morelec, M.J., Faure, M. und Marechal, J. (1960) Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 867-876
- 76) White, D.C. und Tucker, A.N. (1969) J. Lipid Res. 10, 220-233
- 77) Benns, G. und Proulx, P. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 382-389
- 78) Kates, M. (1964) Advances Lipid Res. 2, 17-90
- 79) Dos Santos Mota, J.M., Op den Kamp, J.A.F., Verheij, H.M. und van Deenen (1970) J. Bacteriol. 104, 611-619
- 80) Cronan, Jr., J.E., Nunn, W.D. und Batchelor, J.G. (1974) Biochim. Biophys. Acta 348, 63-75
- 81) Khuller, G.K. und Goldfine, H. (1974) J. Lipid Res. 15, 500-507
- 82) Hildebrand, J.G. und Law, J.H. (1964) Biochemistry 3, 1304-1308
- 83) Silbert, D.F. (1970) Biochemistry 9, 3631-3640
- 84) Rullkötter, J., Heinz, E. und Tulloch, A.P. (1975) Z. Pflanzenphysiol. 76, 163-175
- 85) MacLeod, P. und Brown, J.P. (1963) J. Bacteriol. 85, 1056-1060
- 86) Jungking, P.L. und Wood, R.C. (1974) Biochim. Biophys. Acta 337, 298-310
- 87) Freimer, E.H. (1963) J. Exp. Med. 117, 377-399
- 88) Shaw, N. Heatherington, K. und Baddiley, J. (1968) Biochem. J. 107, 491-496
- 89) Goldfine, H. und Bloch, K. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2596-2601
- 90) Tietz, N. und Stern, A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 296, 130-135
- 91) Weinbaum, G. und Panos, C. (1966) J. Bacteriol. 92, 1576-1577
- 92) Alaud, G., Jouve, H. und Pelmont, J. (1972) Biochimie 55, 1287-1297
- 93) Cho, K.Y. und Salton, M.R.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 116, 73-79

- 94) Brindley, D.N., Matsumura, S. und Bloch, K. (1969) Nature 224, 666-669
- 95) Vagelos, P.R. (1973) in The Enzymes (Boyer, P.D. edit.) 3. Auflage, Band VIII, S. 155-199, Academic Press New York und London
- 96) Bloch, K. (1971) in The Enzymes (Boyer, P.D. edit.) 3. Auflage, Band V, S. 441-464, Academic Press New York und London
- 97) Rosenfeld, J.S., D'Agnolo, G. und Vagelos, P.R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2452-2460
- 98) Bloch, K. (1969) Accounts Chem. Res. 2, 193-202
- 99) Hoffmann, K. und Tausig, F. (1955) J. Biol. Chem. 213, 415-423
- 100) O'Leary, W.M. (1965) Biochemistry 4, 1621-1627
- 101) Gelman, E.P. und Cronan, Jr., J.E. (1972) J. Bacteriol. 112, 381-387
- 102) Cronan, Jr., E.P., Weisberg, L.J. und Allen, R.G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5835-5840
- 103) D'Agnolo, G., Rosenfeld, J.S. und Vagelos, P.R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5289-5294
- 104) Cronan, Jr., J.E. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7074-7077
- 105) Hancock, I.C. und Meadow, P.M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 187, 366-379
- 106) Peleg, E. und Tietz, A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 306, 368-379
- 107) Kaneda, T. (1972) Biochim. Biophys. Acta 270, 32-39
- 108) Okuyama, H., Kankura, T. und Nojima, S. (1967) J. Biochem. 61, 732-737
- 109) Kosaric, N. und Carroll, K.K. (1971) Biochim. Biophys. Acta 239, 428-442
- 110) Aibara, S. Kato, M. Ishinaga, M. und Kito, M. (1972) Biochim. Biophys. Acta 270, 301-306
- 111) Pieringer, R.A., Bonner, Jr., H. und Kunnes, R.S. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2719-2724
- 112) Van den Bosch, H. und Vagelos, P.R. (1970) Biochim. Biophys. Acta 218, 233-248

- 113) Sinensky, M. (1971) J. Bacteriol. 106, 449-455
- 114) Cronan, Jr., J.E., Ray, T.K. und Vagelos, P.R. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 65, 737-744
- 115) Hechemy, K. und Goldfine, H. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 245-247
- 116) Ray, T.K., Cronan, Jr., J.E., Mavis, R.D. und Vagelos P.R. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6442-6448
- 117) Ailhaud, G.P. und Vagelos, P.R. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3866-3868
- 118) Okuyama, H. und Wakil, S.J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5197-5205
- 119) Kito, M., Ishinaga, M., Nishihara, M., Kato, M., Sawada, S. und Hata, T. (1975) Europ. J. Biochem. 54, 55-63
- 120) Goldfine, H. und Ailhaud, G.P. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1127-1133
- 121) Overath, P., Pauli, G. und Schairer, H.U. (1969) Europ. J. Biochem. 7, 559-574
- 122) Krag, S.S., Robinson, M.D. und Lennarz, W.J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 337, 271-277
- 123) Pieringer, R.A. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4894-4903
- 124) Smith, P.F. (1969) J. Bacteriol. 99, 480-486
- 125) Elbein, A.D. (1974) J. Am. Oil Chemists' Soc. 51, 528A
- 126) Kaufmann, B., Kundig, F.D. und Roseman, S. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 312-318
- 127) Veerkamp, J.H. (1974) Biochim. Biophys. Acta 348, 23-34
- 128) Lennarz, W.J. und Talamo, B. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2707-2719
- 129) Stern, N. und Tietz, A. (1971) FEBS-Letters 19, 217-220
- 130) Cronan, Jr., J.E. und Vagelos, P.R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265, 25-60
- 131) Ambron, R.T. und Pieringer, R.A. (1973) in Form and Function of Phospholipids (Ansell, G.B., Hawthorne, J.N. und Dawson, R.M.C. edit.), B.B.A. Library, Band III, S. 289-331, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-London-New York

- 132) Hirschberg, C.B. und Kennedy, E.P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 648-651
- 133) Tunaitis, E. und Cronan, Jr., J.E. (1973) Archiv Biochem. Biophys. 155, 420-427
- 134) Audet, A., Cole, R. und Proulx, P. (1975) Biochim. Biophys. Acta 380, 414-420
- 135) Short, S.A. und White, D.C. (1972) J. Bacteriol. 109, 820-826
- 136) De Siervo, A.J. und Salton, M.R.J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 239, 280-292
- 137) Burritt, M.F. und Henderson, T.O. (1975) J. Bacteriol. 123, 972-977
- 138) De Siervo, A.J. und Reynolds, J.W. (1975) J. Bacteriol. 123, 294-301
- 139) Hostetler, K. Y., van den Bosch, H. und van Deenen, L.L.M. (1972) Biochim. Biophys. Acta 260, 507-513
- 140) Silbert, D.F., Ulbright, T.M. und Honegger, J.L. (1973) Biochemistry 12, 164-171
- 141) White, D.C. und Frerman, F.E. (1968) J. Bacteriol. 95, 2198-2209
- 142) White, D.C. (1968) J. Bacteriol. 96, 1159-1170
- 143) Short, S.A. und White, D.C. (1970) J. Bacteriol. 104, 126-132
- 144) McElhaney, R.N. und Tourtellotte, M.E. (1970) J. Bacteriol. 101, 72-76
- 145) Doi, O. und Nojima, S. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5208-5214
- 146) Albright, F.K., White, D.A. und Lennarz, W.J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3968-3977
- 147) Proulx, P.R. und van Deenen, L.L.M. (1966) Biochim. Biophys. Acta 125, 591-593
- 148) Kanemasa, Y., Akamatsu, Y. und Nojima, S. (1967) Biochim. Biophys. Acta 144, 382-390
- 149) De Siervo, A.J. (1969) J. Bacteriol. 100, 1342-1349
- 150) Peypoux, F. und Michel, G. (1970) Biochim. Biophys. Acta 218, 453-462

- 151) Krag, S.S. und Lennarz, W.J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2813-1822
- 152) Glaser, L. und Lindsay, B. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 1131-1136
- 153) Edmur, L. und Chu, T.H. (1975) FEBS-Letters 55, 216-219
- 154) Veerkamp, J.H. und van Schaik, F.W. (1974) Biochim. Biophys. Acta 348, 370-387
- 155) Shockman, G.D. (1963) in Analytical Microbiology (Kavanagh, F. edit.), S. 581, Academic Press, New York und London
- 156) Rouser, G., Kritchevsky, G., Yamamoto, A., Simon, G., Galli, Cl. und Bauman, A.J. (1969) in Methods in Enzymology (Lowenstein, J.M. edit.), Band XIV, S. 295, Academic Press, New York und London
- 158) Tocane, J.F., Ververgaert, P.H.J.Th., Verkleij, A.J. und van Deenen, L.L.M. (1974) Chem. Phys. Lipids 12, 201-209
- 159) Wagner, H., Hörhammer, P. und Wolff, P. (1961) Biochem. Z. 334, 175-184
- 160) Brotherus, J. und Renkonen, O. Chem. Phys. Lipids 12 (in Druck)
- 161) Organikum, 9. Auflage (1970), S. 598, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
- 162) Dalglish, C.E., Horning, E.C., Horning, M.G., Knox, K.L. und Yarger, K. (1966) Biochem. J. 101, 792-810
- 163) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature The Nomenclature of Lipids (1968) Biochim. Biophys. Acta 152, 1-9

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

Herrn Professor Dr. W. Fischer danke ich für Überlassung des Themas und sein Interesse während meiner experimentellen Arbeit. Zu besonderem Dank fühle ich mich ihm verpflichtet für die kritischen Diskussionen sowie für die Unterstützung bei der Sichtung der Ergebnisse und der Abfassung des Manuskripts. Außerdem danke ich ihm für die Überlassung der Abbildungen 1-5, 7, 8, 12 und der Tabellen 3 und 5, sowie dafür, daß er mir seine umfangreiche Literatursammlung zur Verfügung stellte.

Herrn Dr. I. Ishizuka danke ich für den Lipidrohextrakt aus *S.haemolyticus*, Herrn Dr. R.D. Schmid für die gereinigten Lipide aus *S.lactis*.

Den Mitarbeitern unseres Arbeitskreises danke ich für Anregungen und wertvolle Diskussionen.

Lebenslauf

Am 26. 8. 1942 wurde ich, Hans-Robert Landgraf, als Sohn des Textilkaufmannes Paul Landgraf und seiner Ehefrau Charlotte, geborene Pfeifer, in Chemnitz geboren.

Im September 1949 trat ich in die Volksschule in Oberlungwitz bei Chemnitz ein. Im Dezember 1952 zogen meine Eltern mit mir in die BRD nach Augsburg, wo ich im September 1955 in die 2. Klasse der Höheren Handelschule in Augsburg eintrat.

Ein Jahr später wechselte ich in das Holbein Gymnasium in Augsburg. Im Juli 1963 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab. Anschließend wurde ich für ein Jahr in die Bundeswehr einberufen.

Das pharmazeutische Apothekenpraktikum führte ich vom Oktober 1964 bis September 1966 in der Anna Apotheke in Augsburg durch.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Pharmaziestudium und schloß dieses an der gleichen Universität mit dem pharmazeutischen Staatsexamen im Februar 1971 ab.

Meine experimentelle Arbeit bei Professor Dr. W. Fischer am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg begann im März 1971.

BUCHDRUCKEREI LUDWIG MÜLLER ERLANGEN